

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/00, C12Q 1/68, C12P 21/02, A61K 48/00, 38/17, 45/00, 31/70	A1	(11) 国際公開番号 WO00/14210
		(43) 国際公開日 2000年3月16日(16.03.00)

(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04853	1999年9月7日(07.09.99)	
(22) 国際出願日 1998年9月7日(07.09.98)		JP
(30) 優先権データ 特願平10/252683		
(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 株式会社 中外分子医学研究所(CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユー ラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 根津淳一(NEZU, Jun-ichi)[JP/JP] 奥 飛鳥(OKU, Asuka)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書
(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		

(54)Title: SYSTEMIC CARNITINE DEFICIENCY GENE AND UTILIZATION THEREOF

(54)発明の名称 全身性カルニチン欠乏症遺伝子およびその利用

(57) Abstract

It is clarified that OCTN2 gene participating in the organic cation transportation is a gene causative of systemic carnitine deficiency. It is also found that systemic carnitine deficiency can be examined by detecting whether or not this gene has mutation. It is furthermore found that patients with systemic carnitine deficiency can be treated by using normal OCTN2 gene, its protein, etc.

(57)要約

有機力チオノの輸送に関与する OCTN2 遺伝子が、全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子であることを突きとめた。この遺伝子に変異が存在するか否かを検出することにより、全身性カルニチン欠乏症の検査を行うことが可能であることを見出した。さらに、正常な OCTN2 遺伝子やそのタンパク質等を利用して全身性カルニチン欠乏症患者の治療を行うことも可能であることを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SDE スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SEG スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK シリ・ランカ	SIG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SIG シロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レント	SKR スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SLN シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LJ ルクセンブルグ	SZL セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZD スウェーデン
BF ブルキナ・ファン	GH ガーナ	MA モロッコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドavia	TZ タンザニア
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TT トリニダッド・トバゴ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	UGA ウクライナ
CG コンゴー	ID インドネシア	MN モンゴル	UGG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	USA 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	UZL ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	VVN ヴィエトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジニエール	YU ユーロースラビア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZAF 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZWE ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明細書

全身性カルニチン欠乏症遺伝子およびその利用

技術分野

本発明は、全身性カルニチン欠乏症の検査および治療に用いられる分子、並びに全身性カルニチン欠乏症の検査方法に関する。

背景技術

全身性カルニチン欠乏症(Systemic Carnitine Deficiency, SCD)は骨格筋疾患および心筋疾患を主徴候とする常染色体劣性遺伝を示すヒトの遺伝病(NIM 212140)である(Roe, C.R. & Coates, P.M. Mitochondrial fatty acid oxidation disorder. in The metabolic and molecular bases of inherited diseases 7th ed (eds Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. McGraw-Hill, New York, pp 1508-1509 1995)、Karpati, G. et al. The syndrome of systemic carnitine deficiency: clinical, morphologic, biochemical, and pathophysiologic features. Neurology 25, 16-24 (1975))。この症候群の患者の血清カルニチンレベルや組織内カルニチンレベルは健常人と比較し著しく低いことが知られている。カルニチンは長鎖脂肪酸代謝に必須なコファクターである。細胞内の脂肪酸はカルニチンを介した機構によりミトコンドリアの外膜、内膜を通過できるようになり、ミトコンドリア内において β 酸化を受け、エネルギーが産生される(Walter, J.H. L-Carnitine. Arch Dis Child 74, 475-478 (1996)、Bremer, J. Carnitine metabolism and functions. Physiol Rev 63, 1420-1480 (1983))。全身性カルニチン欠乏症患者においてはその異常なカルニチン濃度の低下が、筋肉といったエネルギーを大量に必要とする組織の疾患に対する直接の原因になっていると考えられる。全身性カルニチン欠乏症患

者から得られた纖維芽細胞を用いた膜生理学的な研究からは、これらの細胞においてはカルニチンを細胞外から細胞内へ輸送する機構が欠損していることが示されており、この機構に関与するタンパクをコードする遺伝子が、この遺伝病の原因遺伝子であると推測されている (Tein, I. et al. Impaired skin fibroblast carnitine uptake in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy. *Pediatr Res* 28, 247-255 (1990))。しかしながら、全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子はいまだ単離されていない。

発明の開示

本発明は、全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子を提供することを課題とする。さらに、本発明は、全身性カルニチン欠乏症の検査および治療に用いられる分子、並びに全身性カルニチン欠乏症の検査方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、有機カチオンの輸送に関与するタンパク質をコードする複数の遺伝子を単離し、これら遺伝子の中に、カルニチンをナトリウムイオン依存的に輸送する活性を有するヒト遺伝子（ヒト OCTN2 遺伝子）およびこれに対応するマウス遺伝子（マウス OCTN2 遺伝子）を見出している（特願平 9-260972 号、特願平 10-156660 号）。本発明者らは、単離した OCTN2 遺伝子が全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子である可能性があると考え、その検証を行った。

具体的には、全身性カルニチン欠乏症のモデルマウスおよび全身性カルニチン欠乏症患者における OCTN2 遺伝子の塩基配列の解析を行った。その結果、本発明者らは、該モデルマウスおよび全身性カルニチン欠乏症患者の双方において、OCTN2 遺伝子に種々の変異が存在することを見出した。即ち、本発明者らは、全身性カルニチン欠乏症が OCTN2 遺伝子の変異により発症することを世界で初めて解明することに成功した。

そして、この OCTN2 遺伝子の変異と全身性カルニチン欠乏症との密接な関係から、本発明者らは、患者の OCTN2 遺伝子に変異が存在するか否かを検出することにより、全身性カルニチン欠乏症の検査を行うことが可能であることを見出した。

さらに、本発明者らは、正常な OCTN2 遺伝子やそのタンパク質を利用して全身性カルニチン欠乏症患者の治療を行うことも可能であることを見出し、これにより本発明を完成するに至った。

従って、本発明は、全身性カルニチン欠乏症の検査および治療に用いられる分子、並びに全身性カルニチン欠乏症の検査方法に関し、より具体的には、

(1) 配列番号：5 に記載の塩基配列からなる DNA またはその転写制御領域にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有する、全身性カルニチン欠乏症の検査に用いるための DNA、

(2) 全身性カルニチン欠乏症の治療に用いるための下記 (a) から (c) のいずれかに記載の分子、

(a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の活性を促進する化合物。

(c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(3) (2) に記載の分子を有効成分とする、全身性カルニチン欠乏症治療薬、

(4) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する抗体を有効成分とする、全身性カルニチン欠乏症検査薬、

(5) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA またはその転写制御領域における変異を検出することを特徴とする、全身性カルニチン欠乏症の検査方法、

(6) (5) に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であつて、

- (a) 患者から DNA 試料を調製する工程、
- (b) (1)に記載の DNA をプライマーとして用いて患者由来の DNA を増幅する工程、
- (c) 増幅した DNA を切断する工程、
- (d) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程、
- (e) 分離した DNA 断片に対し、検出可能な標識をした (1) に記載の DNA をプローブとしてハイブリダイズさせる工程、および
- (f) 検出された DNA 断片の大きさを、健常者の対照と比較する工程、
を含む方法、

- (7) (5) に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、
 - (a) 患者から RNA 試料を調製する工程、
 - (b) 大きさに応じて調製した RNA を分離する工程、
 - (c) 分離した RNA に対し、検出可能な標識をした (1) に記載の DNA をプローブとしてハイブリダイズさせる工程、および
 - (d) 検出された RNA の大きさを、健常者の対照と比較する工程、
を含む方法、

- (8) (5) に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、
 - (a) 患者から DNA 試料を調製する工程、
 - (b) (1) に記載の DNA をプライマーとして患者由来の DNA を増幅する工程、
 - (c) 増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる工程、
 - (d) 解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程、および
 - (e) 分離した一本鎖 DNA のゲル上の移動度を健常者の対照と比較する工程、
を含む方法、

- (9) (5) に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、
 - (a) 患者から DNA 試料を調製する工程、
 - (b) (1) に記載の DNA をプライマーとして患者由来の DNA を増幅する工程、

(c) 増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程、および

(d) 分離した DNA のゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、
を含む方法、を提供するものである。

本発明は、全身性カルニチン欠乏症が「OCTN2」と名付けられた遺伝子の変異
に起因して発症するという本発明者等による知見に基づく。本発明は、第一に、
全身性カルニチン欠乏症の検査に用いられる分子および該分子を利用した全
身性カルニチン欠乏症の検査方法に関する。

本発明において、全身性カルニチン欠乏症の検査に用いられる分子としては、
OCTN2 をコードするゲノム DNA 領域（例えば、配列番号：5）またはその制御
領域（イントロン配列、プロモーター、エンハンサー配列も含む）の塩基配列
にハイブリダイズするオリゴスクレオチド（プローブおよびプライマー）が利
用される。

該オリゴスクレオチドは、好ましくは OCTN2 をコードするゲノム DNA 領域ま
たはその制御領域の塩基配列に特異的にハイブリダイズするものである。ここ
で「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件
下、好ましくはストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下（例えば、
サムブルックら, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory
Press, New York, USA, 第2版 1989 に記載の条件）で、他のタンパク質をコード
する DNA とクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを指す。

プライマーとして用いられる場合、オリゴスクレオチドは、通常、15bp～100bp
であり、好ましくは 17bp～30bp である。プライマーは、OCTN2 遺伝子またはそ
の発現を調節する領域の少なくとも一部を増幅しうるものであればいかなるも
のもよい。このような領域としては、例えば、OCTN2 遺伝子のエキソン領域、
イントロン領域、プロモーター領域、エンハンサー領域が含まれる。
一方、プローブとしてのオリゴスクレオチドは、合成オリゴスクレオチドで

あれば、通常、少なくとも 15bp 以上の鎖長を有する。プラスミド DNA などのベクターに組み込んだクローンから得た二本鎖 DNA をプローブとして用いることも可能である。プローブとしては、OCTN2 遺伝子またはその発現を調節する領域の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするものあればいかなるものでもよい。プローブがハイブリダイズする領域としては、例えば、OCTN2 遺伝子のエキソン領域、イントロン領域、プロモーター領域、エンハンサー領域が含まれる。プローブとして用いる場合、オリゴヌクレオチドあるいは二本鎖 DNA は適宜標識して用いられる。標識する方法としては、例えば、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いてオリゴヌクレオチドの 5' 端を ^{32}P でリン酸化することにより標識する方法や、クレノウ酵素などの DNA ポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドなどをプライマーとして ^{32}P などのアイソトープや、蛍光色素あるいはビオチンなどによって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法など）が挙げられる。

本発明において「全身性カルニチン欠乏症の検査」とは、OCTN2 遺伝子の変異に起因して全身性カルニチン欠乏症の症状を発現している患者の検査のみならず、被験者が OCTN2 遺伝子の変異に起因する全身性カルニチン欠乏症にかかりやすいか否かを判断するために行う、OCTN2 遺伝子の変異の検査も含まれる。すなわち、OCTN2 対立遺伝子の片方に変異が生じることにより、表面上は未だ症状を発現していない場合においても、全身性カルニチン欠乏症にかかる危険性が非常に増大しているものと考えられる。このような片方の OCTN2 対立遺伝子に変異を持つ患者（キャリアー）を特定するための検査も含まれる。

本発明におけるこれらヌクレオチドを利用した全身性カルニチン欠乏症の検査は、OCTN2 遺伝子またはその転写制御領域の変異を検出することを特徴とする。本発明の検査方法の一つの態様は、患者の OCTN2 遺伝子の塩基配列を直接決定する方法である。例えば、上記ヌクレオチドをプライマーとして、OCTN2 の変異に起因する疾患の疑いのある患者から単離した DNA を錆型として、

PCR(Polymerase Chain Reaction)法などにより、患者の OCTN2 遺伝子の一部もしくは全部を増幅し、その塩基配列の決定を行う。これを健常者の OCTN2 遺伝子の配列と比較することにより、OCTN2 遺伝子の変異に起因する疾患を検査することができる。

本発明の検査方法としては、このように直接患者由来の DNA の塩基配列を決定する方法以外に種々の方法が用いられる。その一つの態様は、(a)患者から DNA 試料を調製する工程、(b)本発明のプライマーを用いて患者由来の DNA を増幅する工程、(c)増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる工程、(d)解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程、および(e)分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む。

このような方法として、PCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型)法(Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.、Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene. 1991 Aug 1; 6(8): 1313-1318.、Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling.、PCR Methods Appl. 1995 Apr 1; 4(5): 275-282.)が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また試料の量も少なくてすむなどの利点を有するため、特に多数の DNA サンプルをスクリーニングするのに好適である。その原理は以下の如くである。二本鎖 DNA 断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離した DNA 鎖を変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖 DNA が異なる位置に移動する。一塩基の置換によってもこの一本鎖 DNA の高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の

変化を検出することにより DNA 断片に点突然変異や欠失、あるいは挿入などによる変異が存在することを検出することができる。

具体的には、まず、OCTN2 遺伝子の一部、あるいは全部を PCR 法などによつて増幅する。増幅される範囲としては、通常 200～400bp 程度の長さが好ましい。また、増幅される領域としては、OCTN2 遺伝子の全てのエキソン、全てのイントロンの他、OCTN2 遺伝子のプロモーター、エンハンサーも含まれる。PCR の反応条件は、例えば、実施例 1 に記載の条件で行うことができる。PCR による遺伝子断片増幅の際、³²P などのアイソトープ、あるいは蛍光色素やビオチンなどによって標識したプライマーを用いるか、あるいは PCR 反応液に ³²P などのアイソトープ、あるいは蛍光色素やビオチンなどによって標識した基質塩基を加えて PCR を行うことによって合成される DNA 断片を標識する。あるいは PCR 反応後にクレノウ酵素などを用いて ³²P などのアイソトープ、あるいは蛍光色素やビオチンなどによって標識した基質塩基を合成された DNA 断片に付加することによっても標識を行うことができる。こうして得られた標識された DNA 断片を熱を加えることなどにより変性し、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量（5 から 10% 程度）のグリセロールを添加することにより、DNA 断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各 DNA 断片の性質により変動するが、通常、室温（20 から 25°C）で行い、好ましい分離が得られないときには 4 から 30°Cまでの温度で最適の移動度を与える温度の検討を行う。電気泳動後、DNA 断片の移動度を、X 線フィルムを用いたオートラジオグラフィーや、蛍光を検出するスキャナー等で検出し、解析する。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCR によって再度増幅し、それを直接シークエンシングすることにより、変異の存在を確認することができる。また、標識した DNA を使わない場合においても、電気泳動後のゲルをエチジウムプロマイドや銀染色法などによって染色することによって、バン

ドを検出することができる。

本発明の検査方法の他の態様は、(a)患者から DNA 試料を調製する工程、(b) 本発明のプライマーを用いて患者由来の DNA を増幅する工程、(c) 増幅した DNA を切断する工程、(d) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程、(e) 分離した DNA 断片に対し、検出可能な標識をした本発明のプローブ DNA をハイブリダイズさせる工程、および(f) 検出された DNA 断片の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む。

このような方法としては、制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP)を利用した方法、PCR-RFLP 法などが挙げられる。DNA を切断する酵素としては、通常、制限酵素を用いる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じる DNA 断片内に塩基挿入、または欠失がある場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが健常者と比較して変化する。この変異を含む部分を PCR 法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、染色体 DNA をこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、本発明のプローブ DNA を用いてサザン blotting を行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は、それぞれの変異に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノム DNA 以外にも患者から調製した RNA を逆転写酵素で cDNA にし、これをそのまま制限酵素で切断した後サザン blotting を行うこともできる。また、この cDNA を錆型として PCR で OCTN2 遺伝子の一部、あるいは全部を増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることもできる。

また、患者から調製した DNA の代わりに RNA を用いても同様に検出することが可能である。このような方法は、(a) 患者から RNA 試料を調製する工程、(b) 大きさに応じて調製した RNA を分離する工程、(c) 分離した RNA に対し、検出

可能な標識をした本発明のプローブ DNA をハイブリダイズさせる工程、および (d) 検出された RNA の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む。具体的な方法の一例としては、患者から調製した RNA を電気泳動し、本発明のプローブを用いてノーザンプロッティングを行い、移動度の差を検出する。

本発明の検査方法の他の態様は、(a)患者から DNA 試料を調製する工程、(b) 本発明のプライマーを用いて DNA を増幅する工程、(c) 増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程、および (d) 分離した DNA のゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法である。

このような方法としては、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (denaturant gradient gel electrophoresis : DGGE) が挙げられる。OCTN2 遺伝子の一部、あるいは全部を本発明のプライマーなどを用いた PCR 法などによって増幅し、これを尿素などの変性剤の濃度が移動するに従って徐々に高くなっているポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、健常者と比較する。変異が存在する DNA 断片の場合、より低い変性剤濃度位置で DNA 断片が一本鎖になり、極端に移動速度が遅くなるため、この移動度の差を検出することにより変異の有無を検出することができる。

これら方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド (Allele Specific Oligonucleotide／ASO) ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと試料 DNA でハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンプロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法などにより検出できる。また、リボヌクレアーゼ A ミスマッチ切断法による検出も可能である。具体的には、OCTN2 遺伝子の一部、あるいは全部を PCR 法などによって増幅し、これをプラスミドベクター等に組み込んだ OCTN2 cDNA 等から調製した標識 RNA とハイ

ブリダイゼーションを行う。変異が存在する部分においてはハイブリッドが一本鎖構造となるので、この部分をリボヌクレアーゼ A によって切断し、これをオートラジオグラフィーなどで検出することによって変異の存在を検出することができる。

本発明は、また、OCTN2 タンパク質に結合する抗体を有効成分とする、全身性カルニチン欠乏症の検査薬に関する。OCTN2 タンパク質に結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、OCTN2 タンパク質（天然のタンパク質の他、GST との融合タンパク質として大腸菌において発現させた OCTN2 タンパクのような、適当な宿主細胞（大腸菌、酵母、哺乳類細胞）によって発現させたりコンビナント OCTN2 タンパク質を用いることもできる）若しくはその部分ペプチドをウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、OCTN2 タンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、OCTN2 タンパク質若しくはその部分ペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスマローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、OCTN2 タンパク質に結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、OCTN2 タンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。抗体を検査薬として用いる場合、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、安定剤（BSA やゼラチンなど）、保存剤等を必要に応じて混合

する。全身性カルニチン欠乏症の検査としては、例えば、患者から採取した組織、あるいは単離した細胞を、酵素標識抗体法、蛍光標識抗体法などの方法で染色し、OCTN2 タンパク質の欠損、あるいは異常蓄積、または異常な細胞内分布の検査を行う。全身性カルニチン欠乏症患者から採取した組織、あるいは単離した細胞から細胞抽出液を作製し、これを SDS-PAGE などの方法により分離し、ニトロセルロース膜や PVDF 膜等にタンパクを転写した後、これを上記酵素抗体法等により染色する方法（ウェスタンブロッティング、イムノプロッティング）によっても検査を行うことができる。

また、本発明は、全身性カルニチン欠乏症の治療薬に関する。その一つの態様は、OCTN2 遺伝子を有効成分とする。OCTN2 遺伝子を治療薬として用いる場合、OCTN2 染色体 DNA の全長若しくは一部、または OCTN2 cDNA を適当なベクター、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、あるいはプラスミド DNA などに組み込み、経口投与、静脈内投与、患部への局所投与等により患者に投与する。投与方法としては、インビボ法の他、エクスピボ法を用いることも可能である。投与において、リン脂質などをミセル化して作製したりポソームに遺伝子を封入することにより、組織移行性、組織吸収性を高めることもできる。またカチオン性の脂質を加え、遺伝子 DNA と複合体を形成させることにより、組織移行性、組織吸収性を高めることも可能である。これにより患者体内における変異した OCTN2 遺伝子を正常な遺伝子に置換したり、また、正常な遺伝子を付加的に患者に投与することができる。その結果、全身性カルニチン欠乏症の治療を行うことができる。

本発明の全身性カルニチン欠乏症の治療薬に関する他の態様は、OCTN2 タンパク質を有効成分とする。ヒト OCTN2 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：1 に、マウス OCTN2 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：3 に示す。OCTN2 タンパク質は、天然のタンパク質として、また遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。天然のタンパク質は、当業者

に周知の方法、例えば、OCTN2 タンパク質の部分ペプチドに対する抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィーを行うことにより、OCTN2 タンパク質発現の高い組織や細胞（例えば、胎児腎臓）から単離することが可能である。一方、組換えタンパク質は、例えば、OCTN2 タンパク質をコードする DNA（例えば、配列番号：2）で形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS 細胞、CHO 細胞、NIH3T3 細胞などの哺乳類細胞、Sf9 細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌 (*E. coli*) が挙げられる。また、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしては pcDNA3 (Invitrogen 社製) や pEF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18 (17), p5322) などが、昆虫細胞のベクターとしては「BAC-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL 社製) などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」(Invitrogen 社製) などが、大腸菌のベクターとしては pGEX-5X-1 (Pharmacia 社製)、「QIAexpress system」(Qiagen 社製) などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、カチオニックリポソーム DOTAP (ペーリンガーマンハイム社製) や SuperFect (Qiagen 社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法など用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

得られた OCTN2 タンパク質を全身性カルニチン欠乏症の治療薬として用いる場合には、OCTN2 タンパク質を直接投与することもできるが、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することもできる。例えば、薬剤として一般的に用いられる担体または媒体、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、安定剤、保存剤等と適宜組み合わせて、投与しうる。

投与量は、患者の体重、年齢、健康度、あるいは投与方法などの諸要因に応じて変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することができる。通常、 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim 1000\text{mg}/\text{kg}$ の範囲内である。投与は、経口投与、静脈投与、筋肉内投与、皮下投与などの方法で行うことができる。なお、本発明の薬剤の活性や安定性などを高めるための、OCTN2 タンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸の置換、アミノ酸の付加、欠失は、当業者であれば公知の方法、例えば、例えば、PCR による部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland)、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法 (Kramer, W. and Fritz, HJ (1987) Methods in Enzymol., 154 : 350 - 367)、Kunkel 法 (Methods Enzymol. 85, 2763 - 2766 (1988)) などにより、容易に行うことができる。このような改変 OCTN2 タンパク質も本発明の薬剤に用いることが可能である。

全身性カルニチン欠乏症の治療薬に関する他の態様は、OCTN2 タンパク質の活性を促進する化合物を有効成分とする。OCTN2 タンパク質の活性を促進する化合物のスクリーニングは、以下のように行うことができる。例えば、OCTN2 タンパク質を発現するプラスミドを構築し、これをリン酸カルシウム法により、HEK293 細胞に導入する。この形質転換体に対し、放射標識したカルニチンおよび被検化合物を添加し、細胞内へのカルニチンの輸送活性を検出す。被検化合物非添加時での OCTN2 タンパク質の輸送活性と比較して、その活性を促進する化合物を選択する。具体的な方法については、特願平 9-260972 号および特願平 10-156660 号を参照のこと。

単離した化合物を疾患の治療薬として用いる場合には、上記 OCTN2 タンパク質を治療薬として用いる場合と同様に、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することができる。投与量は、通常、 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim 1000\text{mg}/\text{kg}$ の範囲内である。

全身性カルニチン欠乏症の治療には、これ以外にも、OCTN2 遺伝子の発現を制御する領域もしくはこれに結合する因子を利用する方法が考えられる。

OCTN2 遺伝子の発現を制御する領域を有する OCTN2 遺伝子は、例えば OCTN2 遺伝子の発現が欠失または欠損している患者に導入することにより、生体内における自然な発現制御下で、OCTN2 遺伝子を発現させることができるために上記の遺伝子治療において特に有用である。

また、OCTN2 遺伝子の上流域からプロモーター部位が特定されれば、この部位を持つリポーター遺伝子発現ベクターを用い、様々な化合物によるリポーター遺伝子産物の産生に及ぼす影響を調べることにより、簡便に OCTN2 遺伝子発現量を調節する化合物をスクリーニングすることができる。このようなスクリーニング方法としては、(a)プロモーター部位の下流にレポーター遺伝子が連結されたベクターを構築する工程、(b)該ベクターを適当な細胞に導入する工程、および(c)該細胞に被検化合物を接触または導入してレポーター遺伝子の活性を検出する工程、を含む方法が挙げられる。被検化合物としては、例えば、タンパク質、ペプチド、合成化合物、天然化合物、遺伝子、遺伝子産物などが挙げられる。

また、プロモーター部位に被検試料を接触させて、該プロモーター部位に結合する化合物（タンパク質など）を選択することにより、OCTN2 遺伝子の発現を制御する化合物をスクリーニングすることも可能である。例えば、プロモーター部位の塩基配列を持つ合成オリゴ DNA などを作製し、これをセファロースなどの適当な支持担体に結合させ、これに細胞抽出液などを接触させることにより、このプロモーター部位に結合し、OCTN2 遺伝子の発現を制御する転写調節因子等を、アフィニティー精製などにより精製することもできる。

図面の簡単な説明

図 1 は、RT-PCR によって増幅されたマウス OCTN2 遺伝子の直接シークエンシングの結果を示す。wt/wt は野生型ホモマウス、jvs/jvs は jvs ホモマウスをそれぞれ表す。jvs マウスの OCTN2 遺伝子には矢印で示した塩基に変異が見られ

る。

図2は、jvsマウスのOCTN2遺伝子に見られた変異をPCR-RFLP法(Cfr 13I切断)により検出した結果を示す電気泳動写真である。三角で示した断片は正常遺伝子由来であり、矢印で示した断片は変異遺伝子より生じた断片である。

図3は、野生型マウスOCTN2と変異型マウスOCTN2のカルニチン輸送活性を測定した結果を示す。野生型(Wild)にはナトリウム依存性のカルニチン輸送活性が見られるが、変異型(Jvs)の場合は全く活性が見られない。MockはcDNAを含まないベクターを対照として用いた場合。

図4は、抗myc抗体を用いたウエスタンプロット解析の結果を示す電気泳動写真である。野生型OCTN2タンパク質(Wild)と変異型OCTN2タンパク質(Jvs)は同程度産生されていることがわかる。MockはcDNAを含まないベクターを対照として用いた場合。

図5は、家系KRのOCTN2遺伝子の解析結果を示す。上部にこの家系の家系図を示した。□は男性、○は女性をそれぞれ表す。黒いシンボルは全身性カルニチン欠乏症を発症していることを表す。下部はPCRの結果を示す電気泳動写真である。「N」は対照として用いた正常遺伝子の結果を表す。三角で示した断片は正常遺伝子由来のPCR産物であり、矢印で示した断片は欠損が存在する遺伝子から由來した断片である。

図6は、OCTN2遺伝子エキソン1のシークエンシング解析の結果を示す。正常OCTN2遺伝子(上のパネル;Wild type)に対し、家系AKに属する全身性カルニチン欠乏症患者のOCTN2遺伝子(下のパネル)には矢印で示した位置に1塩基のシトシンの挿入が見られる。

図7は、OCTN2遺伝子エキソン2のシークエンシング解析の結果を示す。正常OCTN2遺伝子(上のパネル;Wild type)に対し、家系AKに属する全身性カルニチン欠乏症患者のOCTN2遺伝子(下のパネル)には矢印で示した位置にGからAの1塩基置換が見られる。

図8は、家系AKに属する全身性カルニチン欠乏症患者のOCTN2遺伝子に見られた2種類の変異をそれぞれBclIおよびNlaIVを用いたPCR-RFLP法により解析した結果を示す電気泳動写真である。上部にこの家系の家系図を示す。「N」は対照として用いた正常遺伝子の結果を表す。矢印で示した断片は変異遺伝子に由来する断片である。

図9は、OCTN2遺伝子イントロン8／エキソン9領域のシークエンシング解析の結果を示す。正常遺伝子（正常）に対し、家系THに属する全身性カルニチン欠乏症患者由来の遺伝子（患者）にはイントロン8の3'側末端においてスプライシングサイトの変異(AG→AA)が存在することがわかる。上部にこの家系の家系図を示した。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] 全身性カルニチン欠乏症(Systemic Carnitine Deficiency, SCD)の原因遺伝子がOCTN2であることの、マウスおよびヒトにおける証明

本発明者らは、カルニチンをナトリウムイオン依存的に輸送する活性を有するタンパク質をコードするヒトcDNAおよびこれに対応するマウスcDNAを単離している（特願平9-260972号、特願平10-156660号）。本発明者らにより単離されたヒトOCTN2cDNAおよびマウスOCTN2cDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：2および配列番号：4に、これらcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1および配列番号：3に示す。

本発明者らは、OCTN2が全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子ではないかという作業仮説を立て、これを検証する実験を行った。

(1) jvs(juvenile visceral steatosis)マウスにおけるOCTN2遺伝子の解析

jvs (juvenile visceral steatosis) マウスは C3H.OH 系統マウスより突然変異により生じたマウスである。このマウスはヒト全身性カルニチン欠乏症患者と類似した症状を示し、その血中、組織中カルニチン濃度は著しく低いことが明らかにされている。またこの表現型は常染色体劣性遺伝形式により遺伝する。以上のことより jvs マウスはヒト全身性カルニチン欠乏症のモデルマウスであると考えられている (Hashimoto, N. et al. Gene-dose effect on carnitine transport activity in embryonic fibroblasts of JVS mice as a model of human carnitine transporter deficiency. Biochem Pharmacol 55, 1729-1732 (1998))。そこで、まず jvs マウスにおける OCTN2 遺伝子の配列を調べた。具体的には、jvs ホモマウスの腎臓より全 RNA を抽出し、cDNA を合成した後これを鋳型として RT-PCR により jvs マウス OCTN2 cDNA を増幅し、直接シークエンシングすることにより配列を調べた。

PCR による増幅の反応は、5' 側断片については MONB 31 プライマー (5'-gataagcttacgggtgtcccttattcccatacg-3' / 配列番号 : 22) および MONB 20 プライマー (5'-cccatgccaacaaggacaaaaagc-3' / 配列番号 : 23) を作製し、cDNA、10×KOD 緩衝液 (東洋紡社製) 5 μl、2 mM dNTPs 5 μl、25 mM MgCl₂ 2 μl、KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡社製) 0.5 μl、20 μM MONB 31 プライマー 1 μl、20 μM MONB 20 プライマー 1 μl を含む反応液(50 μl) 中で、94°Cで 3 分、「94°Cで 30 秒、50°C で 30 秒、74°Cで 1 分」を 30 サイクル、72°Cで 10 分の条件で行った。また、3' 側断片については、MONB 6 プライマー (5'-tgttttcgtgggtgtgctgatgg-3' / 配列番号 : 24) および MONB 26 プライマー (5'-acagaacagaaaagccctcagtca-3' / 配列番号 : 25) を作製し、cDNA、10×ExTaq 緩衝液 (TaKaRa 社製) 5 μl、2.5 mM dNTPs 4 μl、ExTaq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa 社製) および抗 Taq 抗体 (TaqStart antibody™, CLONTECH 社製) の混合物 1 μl、20 μM MONB 6 プライマー 1 μl、20 μM MONB 26 プライマー 1 μl を含む反応液(50 μl) 中で、94°Cで 2 分、「94°Cで 30 秒、60°Cで 30 秒、74°Cで 2 分」を 30 サイクル、72°Cで 10 分

の条件で行った。

シークエンシングの結果、352番目のロイシンをコードするコドン(CTG)がアルギニンをコードするコドン(CGG)に変異していることが判明した(図1)。この変異は Cfr13I 制限酵素サイトの獲得として PCR-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法により検出することが可能である。この方法で調べたところ、jvs ホモマウス(jvs/jvs)はこの変異を両アリルに持っており、またヘテロマウス(wt/jvs)はこの変異が存在するアリルと野生型のアリルの両方を持つことが明らかとなった(図2左)。さらに、12回以上バッククロス(戻し交配)することにより、遺伝的背景を C57BL/6 に置き換えた jvs マウス(C57BL jvs)においてもこの変異が存在することが示された(図2右)。C57BL jvs マウスは jvs 表現型を指標にした選択を重ねられ作製されたマウスであることから、jvs 表現型とこの OCTN2 遺伝子変異の間には非常に緊密な関連があるといえる。

次に、この変異が活性にどのような影響を及ぼすのかを調べた。野生型マウス OCTN2 を発現するプラスミド DNA と、この変異 OCTN2 を発現するプラスミド DNA をそれぞれ HEK293 細胞に導入し、特願平 10-156660 号に記載のヒト OCTN2 の測定の場合と同様にカルニチン輸送能を測定した(図3)。その結果、野生型マウス OCTN2 はヒトの場合と同様にナトリウム依存性のカルニチン輸送活性を示すのに対し、変異を導入した OCTN2 は全く活性を示さないことが明らかとなった。両タンパク質が同程度の量発現していることは、C 末端に付加した c-myc エピトープ配列(NH₂ - EQKLISEEDL - COOH)に対する抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した(図4)。

以上の結果より、jvs マウスは OCTN2 遺伝子の機能欠失変異により発症しているものと考えられた。

(2) ヒト全身性カルニチン欠乏症患者における OCTN2 遺伝子の解析

ヒト OCTN2 cDNA の配列を用いたデータベースサーチより、ヒト OCTN2 ゲノム

DNA 配列はヒトゲノムプロジェクトの一環として米国 Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL)によって解読されていることを見いたした。しかしそれはいくつかのコスミドクローンの配列として登録されているにすぎなかったため、ヒト OCTN2 cDNA の配列と比較しつなぎ合わせていくことにより、完全なヒト OCTN2 ゲノム DNA 配列を決定した（配列番号：5）。その結果、ヒト OCTN2 遺伝子は 10 個のエキソンと 9 個のイントロンからなる約 26kb の遺伝子であることが明らかとなった。この遺伝子配列から全てのエキソンを 8 つの断片として増幅できる以下の 8 組のプライマーを作製した。

即ち、エキソン 1 については、OCN2 43 (5'-GCAGGACCAAGGCGGCGGTGTCAG-3' / 配列番号：6) および OCN2 44 (5'-AGACTAGAGGAAAAACGGGATAGC-3' / 配列番号：7)、エキソン 2 については OCN2 25 (5'-AGATTTTAGGAGCAAGCGTTAGA-3' / 配列番号：8) および OCN2 26 (5'-GAGGCAGACACCGTGGCACTACTA-3' / 配列番号：9)、エキソン 3 とエキソン 4 については OCN2 27 (5'-TTCACACCCACTTACTGGATGGAT-3' / 配列番号：10) および OCN2 50 (5'-ATTCTGTTTGTGTTGGCTCTTT-3' / 配列番号：11)、エキソン 5 については OCN2 31 (5'-AGCAGGGCCTGGGCTGACATAGAC-3' / 配列番号：12) および OCN2 32 (5'-AAAGGACCTGACTCCAAGATGATA-3' / 配列番号：13)、エキソン 6 については OCN2 33 (5'-TCTGACCACCTCTTCTTCCCATAAC-3' / 配列番号：14) および OCN2 34 (5'-GCCTCCTCAGCCACTGTCGGTAAC-3' / 配列番号：15)、エキソン 7 については OCN2 35 (5'-ATGTTGTTCCCTTGTTATCTTAT-3' / 配列番号：16) および OCN2 36 (5'-CTTGTGTTCTTGTATCGTTATC-3' / 配列番号：17)、エキソン 8 とエキソン 9 については OCN2 37 (5'-TATGTTGTTTGCTCTCAATAGC-3' / 配列番号：18) および OCN2 40 (5'-TCTGTGAGAGGGAGTTGCGAGTA-3' / 配列番号：19)、エキソン 10 については OCN2 41 (5'-TACGACCGCTTCCTGCCCTACATT-3' / 配列番号：20) および OCN2 42 (5'-TCATTCTGCTCCATCTCATTACC-3' / 配列番号：21) を作製した。

3 組のお互いに血縁関係のない全身性カルニチン欠乏症患者を有する家系に

において、ヒト OCTN2 遺伝子の変異を調べた。これらのプライマーを用い、血液細胞より調製したゲノム DNA を鋳型に全エキソンを PCR により増幅し、それを直接シークエンシングすることにより解析を行った。

PCR による増幅の反応は、ゲノム DNA 100ng、10×ExTaq 緩衝液 (TaKaRa 社製) 5 μ l、2.5mM dNTPs 4 μ l、ExTaq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa 社製) および抗 Taq 抗体(TaqStart antibodyTM, CLONTECH 社製) の混合物 1 μ l、20 μ M の各プライマー 1 μ l を含む反応液(50 μ l)中で、94°Cで 2 分、「94°Cで 30 秒、60°Cで 30 秒、74°Cで 2 分」を 36 サイクル、72°Cで 10 分の条件で行った。ただし、エキソン 1 およびエキソン 5 を増幅する場合においては、ゲノム DNA 100ng、2×GC 緩衝液 1 (TaKaRa 社製) 25 μ l、2.5mM dNTPs 8 μ l、LA Taq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa 社製) 0.5 μ l、20 μ M の各プライマー 1 μ l を含む反応液(50 μ l)を用いた。

最初の家系(家系 KR)に属する全身性カルニチン欠乏症患者の OCTN2 遺伝子にはエキソン 1 に 113 bp の欠失が認められた (図 5)。この欠失は開始コドンを含んでおり、完全なタンパク質は産生されないものと考えられる。正しいフレームに存在する利用可能な次の ATG コドンは 177 番目であり、この場合少なくとも 2 つの膜貫通領域が欠失するものと考えられる。この家系に属する 2 人の全身性カルニチン欠乏症患者はこの変異 OCTN2 遺伝子を両アリルに持っていることがわかった。一方、発症していない患者の両親と、患者の 2 人の兄弟はいずれもこの変異遺伝子を片方のアリルに持つだけであった。

二番目の家系 2(家系 AK)における全身性カルニチン欠乏症患者は 2 種類の変異 OCTN2 遺伝子を持つことが明らかとなった。一つは開始コドンのすぐ後に 1 塩基シトシンが挿入されたものであり、このためにフレームシフトが起き正しいタンパク質は全く産生されないと考えられる (図 6)。もう一つの変異は 132 番目のトリプトファンをコードするコドン (TGG) における 1 塩基置換 (G \rightarrow A) であり、このためこのコドンはストップコドン (TGA) に変化していた (図 7)。

これらの変異によりこの患者は活性を持つ OCTN2 タンパク質を産生できないものと考えられる。これらの変異はそれぞれ *Bcnl*、*Nla* IV 制限酵素を用いた PCR-RFLP 解析により検出することが可能であり、その結果、患者の両親はそれぞれの変異を一つずつ持っており、また発症していない患者の兄弟はいずれの変異遺伝子も持っていないことが明らかとなった(図 8)。

三番目の家系(家系 TH)においては OCTN2 遺伝子のイントロン 8 の 3' 側末端におけるスプライシングサイトの変異 (AG→AA) を見いだした(図 9)。この変異により OCTN2 遺伝子は正常なスプライシングができなくなり正常なタンパク質が産生されなくなることが予想される。シークエンシング解析により、この家系に属する全身性カルニチン欠乏症患者はこの変異を両アリルに持っていることが明らかとなった。一方、患者の両親と、発症していない兄弟のうちの一人は一つの変異アリルを持っていることが示された。

以上の結果より、全身性カルニチン欠乏症は OCTN2 遺伝子の変異により生じる遺伝病であることが明らかとなった。この解析に用いた方法はもちろん、それ以外の方法により OCTN2 遺伝子の変異を調べることによって、全身性カルニチン欠乏症の確定診断、出生前診断などを行うことが可能になったものと考えられる。また、全身性カルニチン欠乏症患者に対する OCTN2 遺伝子を用いた遺伝子治療等の方法による治療も可能であると考えられる。

産業上の利用の可能性

本発明により OCTN2 遺伝子が、全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子であることが解明され、これにより OCTN2 遺伝子やそのタンパク質の変異を検出することにより、全身性カルニチン欠乏症の検査を行うことが可能となった。また、本発明により、OCTN2 遺伝子やそのタンパク質を利用して全身性カルニチン欠乏症の治療を行うことが可能となった。

請求の範囲

1. 配列番号：5に記載の塩基配列からなるDNAまたはその転写制御領域にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する、全身性カルニチン欠乏症の検査に用いるためのDNA。
2. 全身性カルニチン欠乏症の治療に用いるための下記(a)から(c)のいずれかに記載の分子。
 - (a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
 - (b) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の活性を促進する化合物。
 - (c) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。
3. 請求項2に記載の分子を有効成分とする、全身性カルニチン欠乏症治療薬。
4. 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する抗体を有効成分とする、全身性カルニチン欠乏症検査薬。
5. 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAまたはその転写制御領域における変異を検出することを特徴とする、全身性カルニチン欠乏症の検査方法。
6. 請求項5に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、
 - (a) 患者からDNA試料を調製する工程、
 - (b) 請求項1に記載のDNAをプライマーとして用いて患者由来のDNAを増幅する工程、
 - (c) 増幅したDNAを切斷する工程、
 - (d) DNA断片をその大きさに応じて分離する工程、
 - (e) 分離したDNA断片に対し、検出可能な標識をした請求項1に記載のDNAをプローブとしてハイブリダイズさせる工程、および

(f) 検出された DNA 断片の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

7. 請求項 5 に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、

(a) 患者から RNA 試料を調製する工程、

(b) 大きさに応じて調製した RNA を分離する工程、

(c) 分離した RNA に対し、検出可能な標識をした請求項 1 に記載の DNA をプローブとしてハイブリダイズさせる工程、および

(d) 検出された RNA の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

8. 請求項 5 に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、

(a) 患者から DNA 試料を調製する工程、

(b) 請求項 1 に記載の DNA をプライマーとして患者由来の DNA を増幅する工程、

(c) 増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる工程、

(d) 解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程、および

(e) 分離した一本鎖 DNA のゲル上の移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

9. 請求項 5 に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、

(a) 患者から DNA 試料を調製する工程、

(b) 請求項 1 に記載の DNA をプライマーとして患者由来の DNA を増幅する工程、

(c) 増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程、および

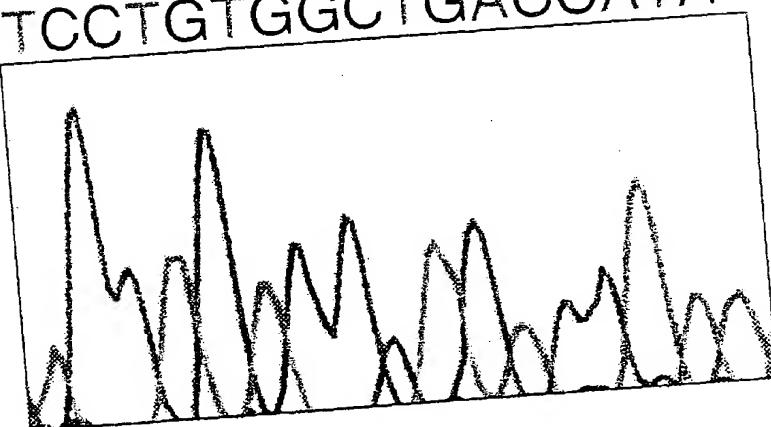
(d) 分離した DNA のゲル上の移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

[x] 1

1105

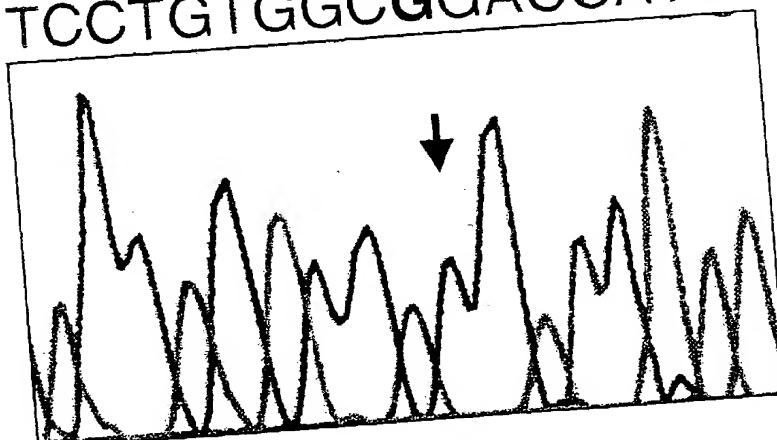
TCCTGTGGCTGACCATA

wt/wt



TCCTGTGGCGGGACCATA

jvs/jvs



2 / 9

図 2

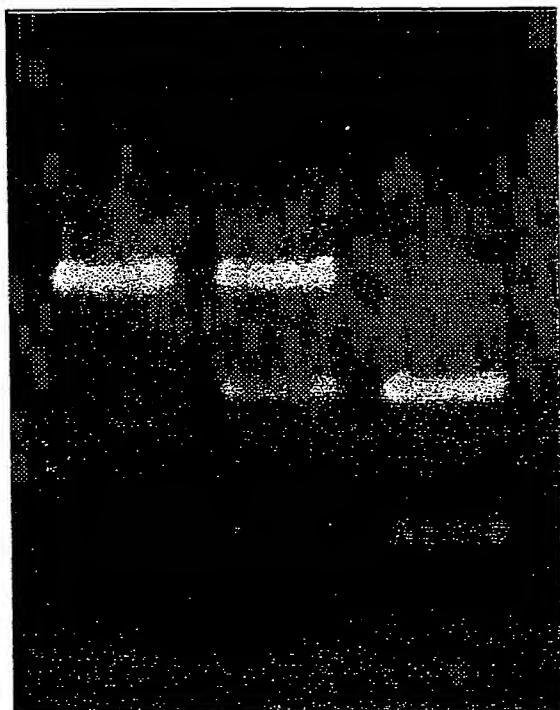
C3H. OH

C57BL/6

wt/wt

wt/jvs

jvs/jvs



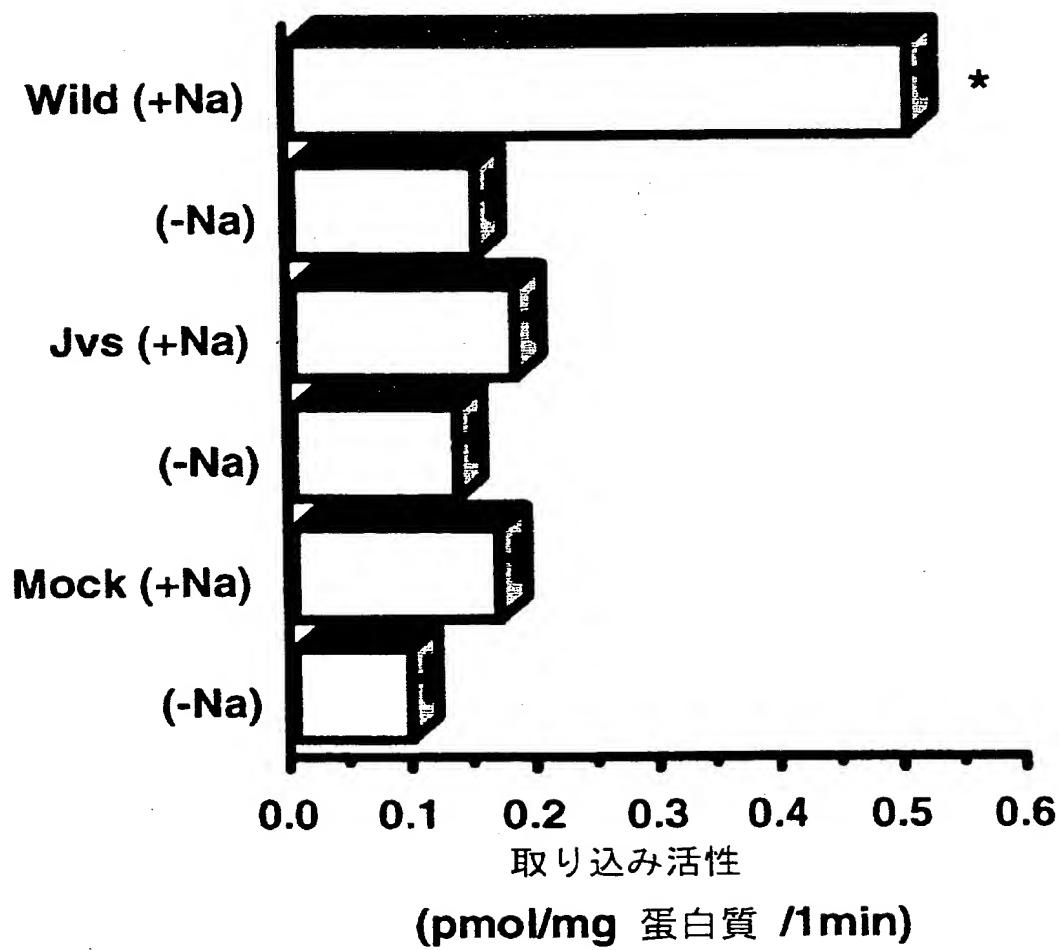
wt/wt

jvs/jvs



3 / 9

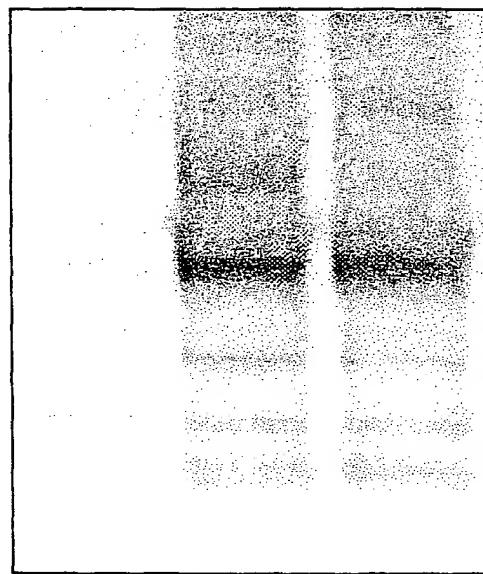
図 3



4 / 9

図 4

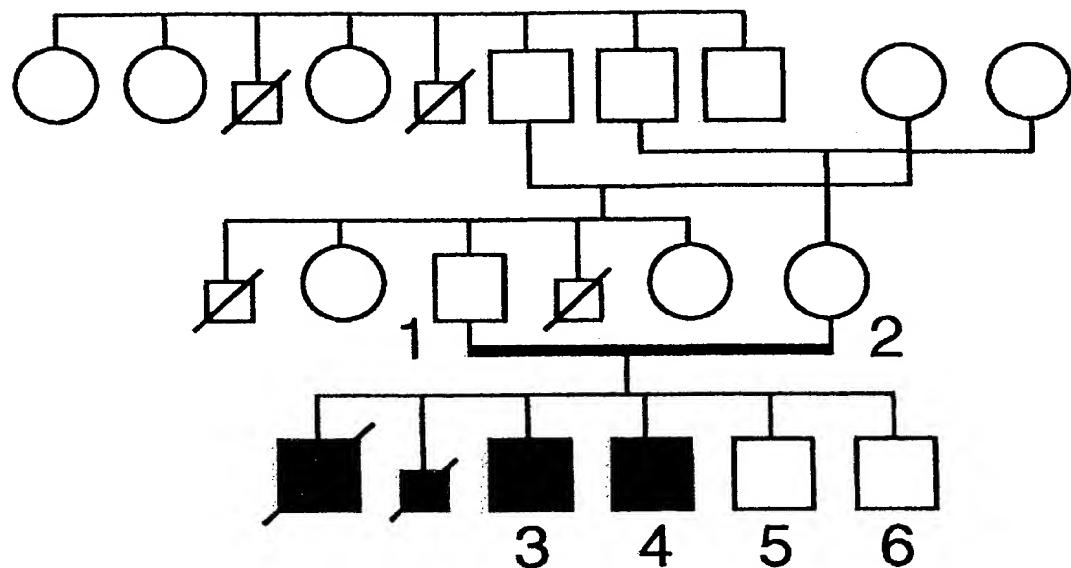
Mock Wild JvS



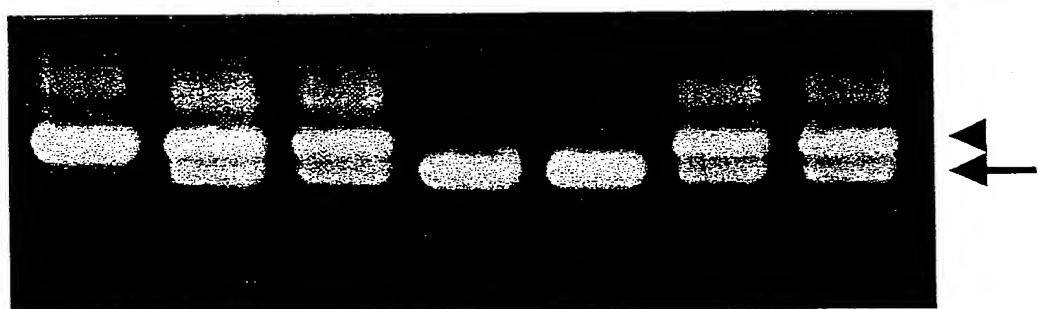
← 60kDa

5 / 9

図 5



N 1 2 3 4 5 6

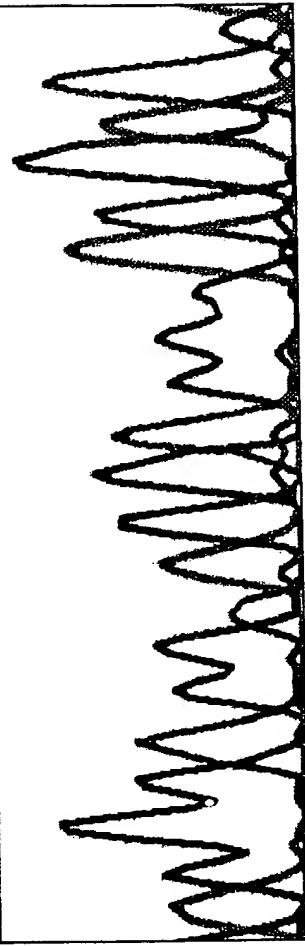


6 / 9

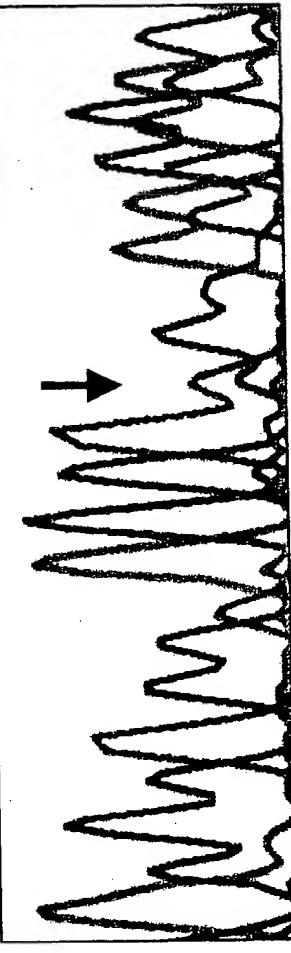
☒ 6

214

AGGGCGGCATGCGGGACTACG



Wild type

CGGGACTAC
AGGGCGGCATGCGGGACTACG

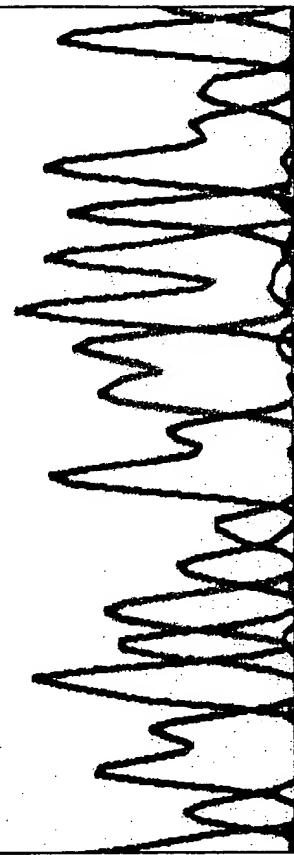
Ins C, nt226

7 / 9

図 7

0898

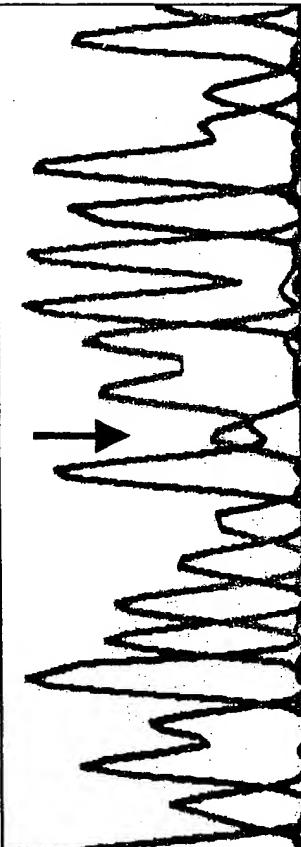
CTTGCAGTGGAACCTGGTG



Wild type

A

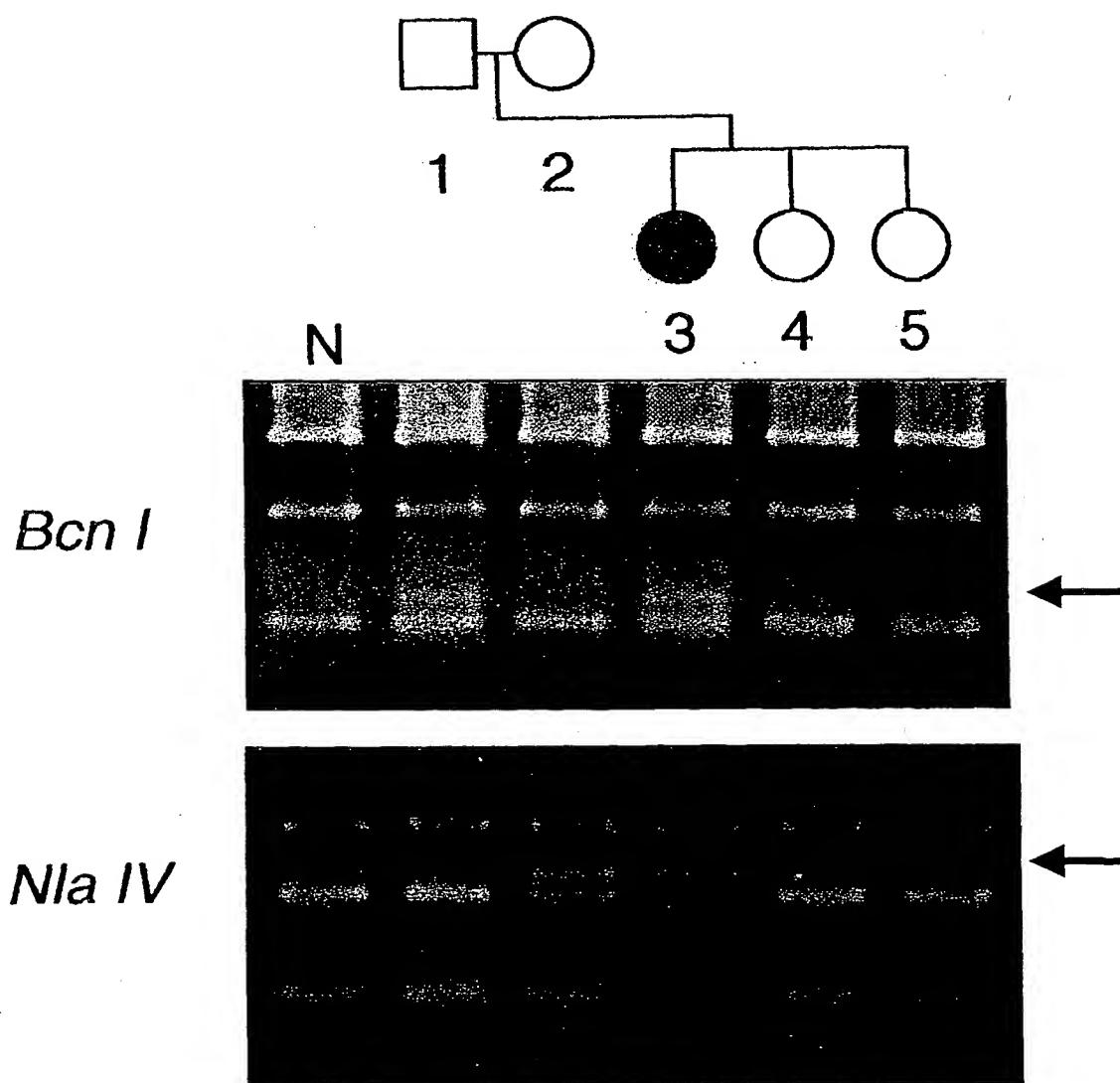
CTTGCAGTGGAACCTGGTG



nt8639 G - A

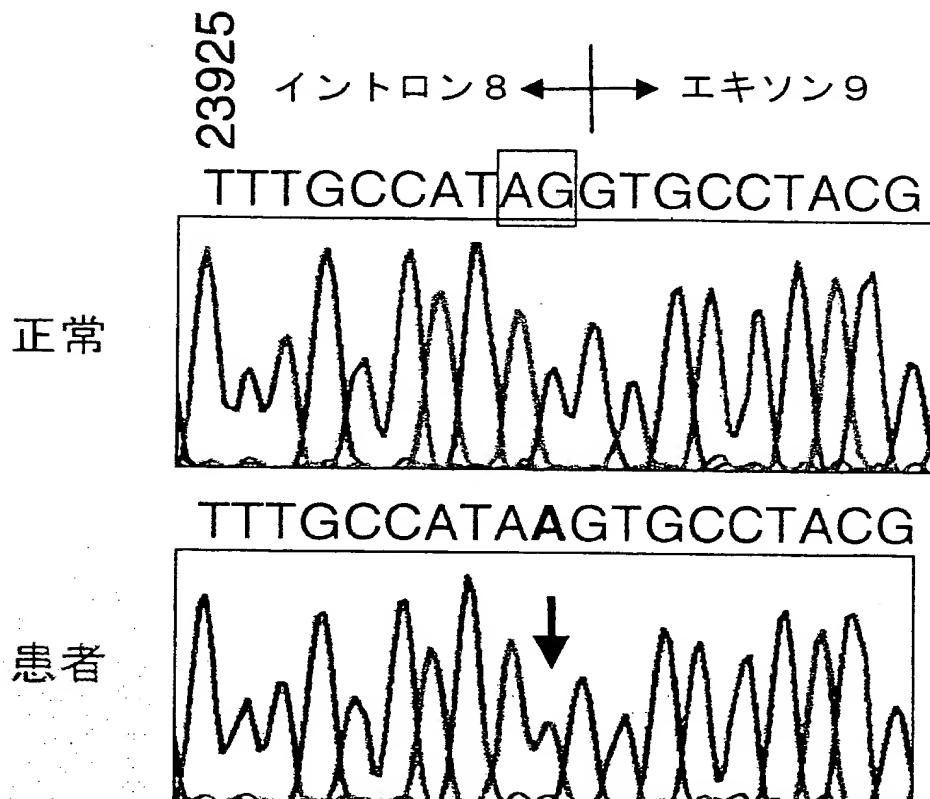
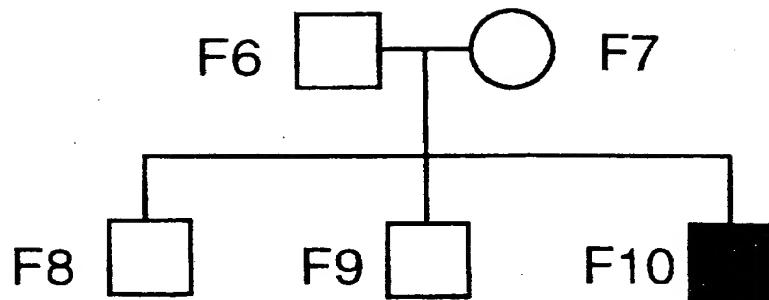
8 / 9

図 8



9 / 9

図 9



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

株式会社中外分子医学研究所

<120> SYSTEMIC CARNITINE DEFICIENCY GENE AND ITS USE

全身性カルニチン欠損症遺伝子およびその利用

<130> C2-007PCT

<150> JP 1998-252683

<151> 1998-09-07

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 557

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

1

5

10

15

Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn

20

25

30

Gly Phe Thr Gly Leu Ser Ser Val Phe Leu Ile Ala Thr Pro Glu His

35

40

45

Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn

50

55

60

His Thr Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp Gly Arg Glu Val Pro His Ser

65

70

75

80

Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Leu Gly

85

90

95

Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Glu Ser

100

105

110

Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln Asp Val Tyr Leu Ser Thr Ile

115

120

125

Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Ala Pro Leu

130

135

140

Thr Ile Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Phe Ile Ser
145 150 155 160

Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Val Thr
165 170 175

Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys Asn
180 185 190

Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile
195 200 205

Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys
210 215 220

Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala
225 230 235 240

Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp
245 250 255

Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val Ala
260 265 270

Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly
275 280 285

Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala Asn

290 295 300

Gly Ile Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp

305 310 315 320

Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu Arg

325 330 335

Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp Met

340 345 350

Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu

355 360 365

His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu Val

370 375 380

Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg

385 390 395 400

Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe

405 410 415

Met Gln Leu Val Pro Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu Val

5/68

420

425

430

Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr Val

435

440

445

Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly

450

455

460

Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe

465

470

475

480

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

485

490

495

Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu Ser

500

505

510

Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys

515

520

525

Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys Asp

530

535

540

Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe

545

550

555

<210> 2

<211> 1831

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (124)..(1794)

<400> 2

cggacggtct tgggtcgccct gctgcctggc ttgcctggtc ggccggcggtt gccccgcgcg 60

cacgcgcaaa gcccgcgcg ttcccgacc ccaggccgcg ctctgtggc ctctgagggc 120

ggc atg cgg gac tac gac gag gtg acc gcc ttc ctg ggc gag tgg ggg 168

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly

1

5

10

15

ccc ttc cag cgc ctc atc ttc ttc ctg ctc agc gcc agc atc atc ccc 216

Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro

20

25

30

aat ggc ttc acc ggc ctg tcc tcc gtg ttc ctg ata gcg acc ccg gag 264

Asn Gly Phe Thr Gly Leu Ser Ser Val Phe Leu Ile Ala Thr Pro Glu

35

40

45

cac cgc tgc cgg gtg ccg gac gcc gcg aac ctg agc agc gcc tgg cgc 312
His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg
50 55 60

aac cac act gtc cca ctg cgg ctg cgg gac ggc cgc gag gtg ccc cac 360
Asn His Thr Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp Gly Arg Glu Val Pro His
65 70 75

agc tgc cgc cgc tac cgg ctc gcc acc atc gcc aac ttc tcg cgc ctc 408
Ser Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Leu
80 85 90 95

ggg ctg gag ccg ggg cgc gac gtg gac ctg ggg cag ctg gag cag gag 456
Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Glu
100 105 110

agc tgt ctg gat ggc tgg gag ttc agt cag gac gtc tac ctg tcc acc 504
Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln Asp Val Tyr Leu Ser Thr
115 120 125

att gtg acc gag tgg aac ctg gtg tgt gag gac gac tgg aag gcc cca 552
Ile Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Ala Pro
130 135 140

ctc aca atc tcc ttg ttc ttc gtg ggt gtg ctg ttg ggc tcc ttc att 600

Leu Thr Ile Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Phe Ile
145 150 155

tca ggg cag ctg tca gac agg ttt ggc cgg aag aat gtg ctg ttc gtg 648
Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Val
160 165 170 175

acc atg ggc atg cag aca ggc ttc agc ttc ctg cag atc ttc tcg aag 696
Thr Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys
180 185 190

aat ttt gag atg ttt gtc gtg ctg ttt gtc ctt gta ggc atg ggc cag 744
Asn Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln
195 200 205

atc tcc aac tat gtg gca gca ttt gtc ctg ggg aca gaa att ctt ggc 792
Ile Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly
210 215 220

aag tca gtt cgt ata ata ttc tct acg tta gga gtg tgc ata ttt tat 840
Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr
225 230 235

gca ttt ggc tac atg gtg ctg cca ctg ttt gct tac ttc atc cga gac 888
Ala Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp
240 245 250 255

tgg cgg atg ctg ctg gtg gcg ctg acg atg ccg ggg gtg ctg tgc gtg 936
Trp Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val
260 265 270

gca ctc tgg tgg ttc atc cct gag tcc ccc cga tgg ctc atc tct cag 984
Ala Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln
275 280 285

gga cga ttt gaa gag gca gag gtg atc atc cgc aag gct gcc aaa gcc 1032
Gly Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala
290 295 300

aat ggg att gtt gtg cct tcc act atc ttt gac ccg agt gag tta caa 1080
Asn Gly Ile Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln
305 310 315

gac cta agt tcc aag aag cag cag tcc cac aac att ctg gat ctg ctt 1128
Asp Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu
320 325 330 335

cga acc tgg aat atc cgg atg gtc acc atc atg tcc ata atg ctg tgg 1176
Arg Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp
340 345 350

atg acc ata tca gtg ggc tat ttt ggg ctt tcg ctt gat act cct aac 1224

10/68

Met Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn

355

360

365

ttg cat ggg gac atc ttt gtg aac tgc ttc ctt tca gcg atg gtt gaa 1272

Leu His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu

370

375

380

gtc cca gca tat gtg ttg gcc tgg ctg ctg ctg caa tat ttg ccc cgg 1320

Val Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg

385

390

395

cgc tat tcc atg gcc act gcc ctc ttc ctg ggt ggc agt gtc ctt ctc 1368

Arg Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu

400

405

410

415

ttc atg cag ctg gta ccc cca gac ttg tat tat ttg gct aca gtc ctg 1416

Phe Met Gln Leu Val Pro Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu

420

425

430

gtg atg gtg ggc aag ttt gga gtc acg gct gcc ttt tcc atg gtc tac 1464

Val Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr

435

440

445

gtg tac aca gcc gag ctg tat ccc aca gtg gtg aga aac atg ggt gtg 1512

Val Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val

450

455

460

gga gtc agc tcc aca gca tcc cgc ctg ggc agc atc ctg tct ccc tac 1560
Gly Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr
465 470 475

ttc gtt tac ctt ggt gcc tac gac cgc ttc ctg ccc tac att ctc atg 1608
Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met
480 485 490 495

gga agt ctg acc atc ctg aca gcc atc ctc acc ttg ttt ctc cca gag 1656
Gly Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu
500 505 510

agc ttc ggt acc cca ctc cca gac acc att gac cag atg cta aga gtc 1704
Ser Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val
515 520 525

aaa gga atg aaa cac aga aaa act cca agt cac aca agg atg tta aaa 1752
Lys Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys
530 535 540

gat ggt caa gaa agg ccc aca atc ctt aaa agc aca gcc ttc 1794
Asp Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe
545 550 555

taacatcgct tccagtaagg gagaaaactga agaggaa 1831

12/68

<210> 3

<211> 557

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro
1 5 10 15

Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn
20 25 30

Gly Phe Asn Gly Met Ser Ile Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His
35 40 45

Arg Cys Leu Val Pro His Thr Val Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn
50 55 60

His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Lys
65 70 75 80

Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Glu Leu Gly
85 90 95

Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser

100

105

110

Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Val Phe Leu Ser Thr Ile

115

120

125

Val Thr Glu Trp Asp Leu Val Cys Lys Asp Asp Trp Lys Ala Pro Leu

130

135

140

Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Met Gly Ser Phe Ile Ser

145

150

155

160

Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Leu Thr

165

170

175

Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Val Phe Ser Val Asn

180

185

190

Phe Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile

195

200

205

Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys

210

215

220

Ser Ile Arg Ile Ile Phe Ala Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala

225

230

235

240

Phe Gly Phe Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp

245

250

255

Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val Pro Gly Val Leu Cys Gly Ala

260

265

270

Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly

275

280

285

Arg Ile Lys Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ile Asn

290

295

300

Gly Ile Val Ala Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp

305

310

315

320

Leu Asn Ser Thr Lys Pro Gln Leu His His Ile Tyr Asp Leu Ile Arg

325

330

335

Thr Arg Asn Ile Arg Val Ile Thr Ile Met Ser Ile Ile Leu Trp Leu

340

345

350

Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu

355

360

365

His Gly Asp Ile Tyr Val Asn Cys Phe Leu Leu Ala Ala Val Glu Val

15/68

370

375

380

Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg

385

390

395

400

Tyr Ser Ile Ser Ala Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe

405

410

415

Met Gln Leu Val Pro Ser Glu Leu Phe Tyr Leu Ser Thr Ala Leu Val

420

425

430

Met Val Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Ser Met Val Tyr Val

435

440

445

Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly

450

455

460

Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe

465

470

475

480

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

485

490

495

Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Phe Pro Glu Ser

500

505

510

16/68

Phe Gly Val Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys

515

520

525

Gly Ile Lys Gln Trp Gln Ile Gln Ser Gln Thr Arg Met Gln Lys Asp

530

535

540

Gly Glu Glu Ser Pro Thr Val Leu Lys Ser Thr Ala Phe

545

550

555

<210> 4

<211> 1888

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (60)..(1730)

<400> 4

ctcccgcgcc acgggtgtccc cttattccca tacgggcgct gtggggaggct gaggacggc 59

atg cgg gac tac gac gag gtg acc gcc ttc cta ggc gag tgg ggg ccc 107

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

1

5

10

15

17/68

ttc cag cgc ctc atc ttc ttc ctg ctc agc gcc agc atc atc ccc aat 155
Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn

20 25 30

ggc ttc aat ggt atg tcc atc gtg ttc ctg gcg ggg acc ccg gag cac 203
Gly Phe Asn Gly Met Ser Ile Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His

35 40 45

cgt tgc ctt gtg cct cac acc gtg aac ctg agc agc gcg tgg cgc aac 251
Arg Cys Leu Val Pro His Thr Val Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn

50 55 60

cac agt atc ccg ttg gag acg aag gac gga cga cag gtg cct cag aaa 299
His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Lys

65 70 75 80

tgc cgc cgc tac cga ctg gcc acc atc gcc aac ttc tct gag cta ggg 347
Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Glu Leu Gly

85 90 95

ctg gag ccg ggg cgg gac gtg gac ctg gag cag ctg gag cag gag agc 395
Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser

100 105 110

tgc ctg gat ggc tgg gag tac gac aag gac gtc ttc ctg tcc acc atc 443
Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Val Phe Leu Ser Thr Ile

115

120

125

gtg aca gag tgg gac ctg gtg tgt aag gat gac tgg aaa gcc cca ctc 491

Val Thr Glu Trp Asp Leu Val Cys Lys Asp Asp Trp Lys Ala Pro Leu

130

135

140

acc acc tcc ttg ttt ttc gtg ggt gtg ctg atg ggc tcc ttc att tca 539

Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Met Gly Ser Phe Ile Ser

145

150

155

160

gga cag ctc tca gac agg ttt ggt cgc aag aat gtg ctg ttt ttg acc 587

Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Leu Thr

165

170

175

atg ggc atg cag act ggc ttc agc ttc ctg cag gtc ttc tct gtg aac 635

Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Val Phe Ser Val Asn

180

185

190

ttc gag atg ttt aca gtg ctt ttt gtc ctt gtt ggc atg ggt cag atc 683

Phe Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile

195

200

205

tcc aac tac gtg gca gca ttt gtc ctg gga aca gaa att ctt tcc aag 731

Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys

210

215

220

19/68

tca att cga att ata ttc gcc acc tta gga gtt tgc ata ttt tat gcg 779

Ser Ile Arg Ile Ile Phe Ala Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala

225 230 235 240

ttt ggc ttc atg gtg ctg cca ctg ttt gca tac ttc atc aga gac tgg 827

Phe Gly Phe Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp

245 250 255

agg atg ctg ctg ctg gcg ctc act gtg cca ggg gtg cta tgt ggg gct 875

Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val Pro Gly Val Leu Cys Gly Ala

260 265 270

ctc tgg tgg ttc atc cct gag tcc cca cga tgg ctc atc tct caa ggc 923

Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly

275 280 285

cga att aaa gag gca gag gtg atc atc cgc aaa gct gcc aaa atc aat 971

Arg Ile Lys Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ile Asn

290 295 300

ggg att gtt gca cct tcc act atc ttc gat cca agt gag tta caa gac 1019

Gly Ile Val Ala Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp

305 310 315 320

tta aat tct acg aag cct cag ttg cac cac att tat gat ctg atc cga 1067

Leu Asn Ser Thr Lys Pro Gln Leu His His Ile Tyr Asp Leu Ile Arg

20/68

325

330

335

aca cgg aat atc agg gtc atc acc atc atg tct ata atc ctg tgg ctg 1115
Thr Arg Asn Ile Arg Val Ile Thr Ile Met Ser Ile Ile Leu Trp Leu

340

345

350

acc ata tca gtg ggc tat ttt gga cta tct ctt gac act cct aac ttg 1163
Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu

355

360

365

cat ggg gac atc tat gtg aac tgc ttc cta ctg gcg gct gtt gaa gtc 1211
His Gly Asp Ile Tyr Val Asn Cys Phe Leu Leu Ala Ala Val Glu Val

370

375

380

cca gcc tat gtg ctg gcc tgg ctg ttg ttg cag tac ttg ccc cgg cga 1259
Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg

385

390

395

400

tat tct atc tcg gct gcc ctt ttc ctg ggt ggc agt gtc ctt ctc ttc 1307
Tyr Ser Ile Ser Ala Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe

405

410

415

atg cag ctg gtg cct tca gaa ttg ttt tac ttg tcc act gcc ctg gtg 1355
Met Gln Leu Val Pro Ser Glu Leu Phe Tyr Leu Ser Thr Ala Leu Val

420

425

430

21/68

atg gtg ggg aag ttt gga atc acc tct gcc tac tcc atg gtc tat gtg 1403
Met Val Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Ser Met Val Tyr Val

435 440 445

tac aca gct gag ctg tac ccc act gtg gtc aga aac atg ggt gtg ggg 1451
Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly

450 455 460

gtc agc tcc aca gca tcc cgc ctt ggc agc atc ctg tct ccc tac ttt 1499
Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe
465 470 475 480

gtt tac cta ggt gcc tat gat cgc ttc ctg cct tat att ctc atg gga 1547
Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

485 490 495

agt ctg acc atc ctg aca gct atc ctc acc ttg ttc ttc cct gag agc 1595
Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Phe Pro Glu Ser
500 505 510

ttt ggt gtc cct ctc cca gat acc att gac cag atg cta agg gtc aaa 1643
Phe Gly Val Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys

515 520 525

gga ata aaa cag tgg caa atc caa agc cag aca aga atg caa aaa gat 1691
Gly Ile Lys Gln Trp Gln Ile Gln Ser Gln Thr Arg Met Gln Lys Asp

530

535

540

ggt gaa gaa agc cca aca gtc cta aag agc aca gcc ttc taacaccctg 1740
Gly Glu Glu Ser Pro Thr Val Leu Lys Ser Thr Ala Phe

545

550

555

tccagaaggc aaaaaactga ttggaaacct tcataatgtgc agaaatgctc tccatgactg 1800

aggcgttttc tgttctgtta accttgcgtc taacatgctc atggattggg gcatctgtcc 1860

tggagagtca ctttcctcta gggacacc 1888

<210> 5

<211> 25871

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<221> exon

<222> (1)..(614)

<220>

<221> intron

<222> (615)..(8636)

<220>

<221> exon

<222> (8637)..(8740)

<220>

<221> intron

<222> (8741)..(14409)

<220>

<221> exon

<222> (14410)..(14564)

<220>

<221> intron

<222> (14565)..(15590)

<220>

<221> exon

<222> (15591)..(15762)

<220>

<221> intron

<222> (15763)..(17282)

<220>

<221> exon

<222> (17283)..(17409)

<220>

<221> intron

<222> (17410)..(19178)

<220>

<221> exon

<222> (19179)..(19279)

<220>

<221> intron

<222> (19280)..(20947)

<220>

<221> exon

<222> (20948)..(21162)

<220>

<221> intron

<222> (21163)..(22690)

<220>

<221> exon

<222> (22691)..(22873)

<220>

<221> intron

<222> (22874)..(23934)

<220>

<221> exon

<222> (23935)..(24070)

<220>

<221> intron

<222> (24071)..(24443)

<220>

<221> exon

<222> (24444)..(25871)

<400> 5

gcggcccaagg cccggaacct tcctggtcg tgcgccatat gtaaggccag ccggcggcagg 60

accaaggcgg cggtgtcagc tcgcgagcct accctccgcg gacggtcttg ggtgcctgc 120

tgcctggctt gcctggtcgg cggcggtgc cccgcgcga cgcgcaaagc ccggcggtt 180

cccaagcccc aggccgcgct ctgtgggcct ctgagggcgg catgcgggac tacgacgagg 240

tgaccgcctt cctggcgag tggggccct tccagcgcct cattttttc ctgctcagcg 300

ccagcatcat ccccaatggc ttcaccggcc tgtcctccgt gttcctgata gcgaccccg 360

agcaccgctg ccgggtgccg gacgcccgcga acctgagcag cgccctggcgc aaccacactg 420

tcccactgctg gctgcgggac ggccgcgagg tgccccacag ctgcccgcgc taccggctcg 480

ccaccatcgcc caacttctcg gcgcctcgccc tggagccggg gcgcgacgtg gacctggggc 540

agctggagca ggagagctgt ctggatggct gggagttcag tcaggacgtc tacctgtcca 600

ccattgtgac cgaggtgggt gccggccct gctggggctg agaccaggc tcggaggacc 660

tgtcgcggtc cttgaacccg agtcctctc tcccagatgc gcactggacg ctgtcactcc 720

ccctccccca acggtaaca cccttagcgtt ggagaccctc cagccaggtg gcttggaaac 780

gcttcacgag gtgacaccttca gccacagtgt gctccctccct gcacaggtgg tcagtctggc 840

ctcccgccct gatggccact ttgaagaggg taccaggaag gtcctggcgg tccctggcgc 900

atgctctatg gccctgtgtg tccaggactt actctagttt gggttggggg tggtaagtag 960

cagagccagg acttggcca gggctatcc cgaaaaatccctt ctagtctttt gatttctttt 1020

tagaaagagaa gaaataacttc tctttcttga acttttaaaa gttaaataaaa gcatgtgtat 1080

acaactgcct cttccctttt tcctctagtt actccttccc ctaccgtcca caacccaaaa 1140

acgacaatct ggtcatgccccc tgtaagtaat tgtttgcctt ttcccatggc cagttgtcag 1200

tctttttttt tttttttttt ttttgagaca gagtcctccct ctgtcaccag gctggagcgc 1260

agtcgtgtgt tcttggctca ctgcaacctt cgcaagtcgtc cgttcttggc tcactgaaat 1320

cttcgcccttc cgggctcaag tgattctcct gcctcaggcct ccgagtagct gtgagccacg 1380

acgcccagct aatttttgtg ttttagtag agacggggtt tcaccgtgtt ggccaggatg 1440

gtctcgatct cttgacacctg tgatctgcct gcttctgcct gcaaagctgg gattacaacc 1500

gtgagccacc acgccaggcc gtcagttgtc actcttaag atccattcat ctgaagatgg 1560

gttcagggtg acttgttgac ctggaatatt ttctcaggta ttatgaggca aggctgtcgg 1620

ccagatttag ttaaagcata cagccttagg tcatagggtg tggggagcc tttctcattt 1680

ctcatcccct tggattttcc ctctgggtgg ttttgtctgt cccctccgaa cctgttggag 1740

cagttgttgg agctggatgt aggaacatga tgttaatgtat gtatgtgttt tgtgtctttt 1800

ttagacactg gcactctagc tccctgaagt ttcagcagca ttgagtaagt agccagttag 1860

tagccctcat tgatagatag gctcaactaaa tgtgcagatg accaattcgc aggttagaga 1920

aggcttcccga aagaggagg cctctcagtgc agcctagggt gttcagctca gcataatagt 1980

gagctgaagg ccccaatgca gcagcaagaa accacccagc aggacggcgg agttcacaga 2040

gaggggagag ttcatagaga gggagagtgc cacagccct ggcacagctt caagccctgc 2100

tggatgttgg tgctgaggcct cccctcctgg agcctcagag gggcttacag gggctctgga 2160

gatcccaact gtgttgcttc ttggcgcat cacccttcaa tggagtctga gagctaccct 2220

gggagatcca agtgtgtgtg catgtgtgtg tttttcttt ttggaaattt gatgtcccc 2280

gcatttggac ctgctttctc cacatatatg tagtggagt gtgaccggag cccactggg 2340

atttcttagc tagtgacata gcttcagtgt ccagaggcat catggcttga caaaagaggc 2400

actccttgaa ggtagccaac tgtgcttct ggcccatgaa tccacagggaa attgaaactt 2460

tcagttgccaa caaatcctgg gtcttagcct cacaggtggg tgtgttacct tcccgaaagc 2520

cagtgagtac tatgaaagca gaggctgtcc ctgagggttgc aggccagaggc cacagagggg 2580

aacatgacac aggaatccct acaaattcta ctggggctg cctaaagaag aggaaagtag 2640

tgaagcaaga agaagcacat ggcacatctttt ggagtttac attgaccctt gagggttccc 2700

cggcttactc tagtcacttg ttccgtctt gctgcctcca tcccacattt ggctgagtga 2760

tggtggcatt gatgagctcc caaaggccag ctgtgccagg gggctgacc ttatcttgc 2820

gc当地atgtca gcctttgtt ttttaatatt tagactattt attagctgt ctttagcgtt 2880

tcaaaggagt tatgtgcctt ttcacactact tatatgttgt cagtcattgc agggaggcca 2940

gattaatgct tagatctttg ttttggccta ctggaatgct tgacttgaag ttcagagctg 3000

cttggccca ggtgaacagc tactgctgga agttgctgca tcaacattct aatggcttt 3060

tctatggcct gttgtcttc aacccaaacc tggcctgctg aacactgcat ctatcccatt 3120

gc当地tgc当地aa tgtctctaag cctgcccctt gccccaaatc atacataaag gtgttgtaa 3180

gtacactgggt attgaattac tagtcatatt ttttccactg aagactggaa cctcagggtgt 3240

cctgtttgga ttttttaat ttgttcaagt taaagtacat acatgttagta ccaaactttg 3300

tggtggattt agatcttgc gtcttcctca atttctgaca caattctgga tgcagaggaa 3360

ggttctcagg aaaatttta ttgaatgagt taatgaataa tttaagaat catctctaaa 3420

gtttgagaac taaagaaaaa tagttcagtt cttagaaggg aaacttgagg gtggctgaaa 3480

aggattgact ggaattttt aaaggaaatg tgactcccc tgcactgaa ctggggctt 3540

gatgccacat ggatgtggaa tgaggtgttgg gattggcag aggaaatctg ctagcaatta 3600

ataaataaat aaatattggc agggcgtggt ggctcacgccc tgtaatccca gcactttggg 3660

aagccaaggc agcaggtcac ttgaggtcg gaggtaaga ccagtctggc caacatggtg 3720

aaactccatc tctactaaaa atacaataaaat tagctgggtg tggtggcaca tgcctgtatt 3780

cccagctact tgggagactg aagcaggaga atcgcttggaa cccaggaggc gggctttgca 3840

gtgaaccgag atcgagcctc tgcactctag cctggcgcac aaagcgagac tccatctcaa 3900

aagaataata ataatattaa taaataaaaa tgatttatga ggtaaaagag ttttatgccc 3960

ccatgttcca ggaatagttt ggtggtccac atggttctcg gctggcctct cctctggccc 4020

ctcagtcatc cctgggtac tgggaatta gccaacccat catgcagtgc ttcttgccca 4080

tggactgccc catctgctgg aaacctgggt tgtttctgag gttgtctgg ctgtccgctc 4140

tttggtttca ccatagctct gtccagccta tggacagaca gtttccttga gaaacttccg 4200

gctgggtgtg gtggctcatg cctgtaaacc cagcactttg ggaggctgag gcaggtggat 4260

cacaaggcag gagttcgaga ccagcctggc caacatggtg aaacctcgac tccgctaaaa 4320

atacaaaaaat tagccctgcg tggtggcgaa tgcctgtaat cccagctact cgggagggag 4380

gctgaggcag gagaatttct tgaacctggg aagtgggggt tgcagtagcc aagatcgac 4440

cattgcatgc cagcctgggt gacaagagca agactccgac taaaaaaaaaaa aaaaagaaaa 4500

agaaaaagaaaa cttccaagct gctctgcattt gccttgcattt ccacctgtct gcttctaaga 4560

agccctcgcc ccagtcctgg gtgggactcc cactccctcc ccattgtcct ggactagctt 4620

ttctatcagc cttatcttgt gtagagacag atagtcttag aagatgagag agccctact 4680

gttatccccca aagctgcctg gaggaaaagc cagagcaacc tgggagctgg gaccggggct 4740

gactctggc agcagagacc cgagagaccc ggaacttcaa cctcaactttt acgcctttgt 4800

tgatttctct cactcagggg acacacagac cctcatccag cttttgcag ctatatggca 4860

aggcagagaa gccacttgcg gggtcccgtg gcccaactatg cacgtacata gtagacacat 4920

ctggccatga gtggtcagat tgagccactc tctagctagc tgacacctgt catcctgggt 4980

caaatttctg acagttgaca caaaggcaggg ggtcagggag ccaaaaaaaaaaa aaatggccag 5040

gtgtggtggc tcttgcctgt aatcccaggg ctttgggagg ccaaggtggg cagataacct 5100

gaggtcagag ttcaagacca gcctggtcaa catggcaaaa ccccggtctt actaaaaata 5160

caaaaaattag ccaggctggt ggtgcattcc tgttagtccca gccactcagg aggctgaggc 5220

atgagaatca cttgaacccg ggaggtggag gttgcagtga gccgagattg tgccactgca 5280

ctccagcctg ggagacagag caagactctg tttcaaaaga aaaaaaaagag tattctggag 5340

attgaagttc aggagttcag ggttcatctc gactttggc agccaagcaa gaactaaagt 5400

ataccaagat gttgaagggtt gataccttt tatttatcga ttcattcact cacctatgta 5460

ccaaagagct cctgagcctc tcttcgatac agggggcact gccaggagtt gtagaggatg 5520

tgatagcaaa gataggaaat acctttctc tttgctctga caacggtgg gcaaggattc 5580

atcattgatt tcagcaggag gcaggataaa atgtgtgt tag gaatata tagga atacatggca 5640

atcagtaaca tgtggtacct agcagcatgt ctgactgtt gatacggtcag gctaggtaca 5700

tccccctcagg gaagaacttc tgtcttaggg gcacacaccc tatctttttt cccttcctgc 5760

caattcacag gtaagaacat ttagtcccag ggaactatgt catctctcta cttctataa 5820

ctgaaaaagc agtgccaatt atgtatgagg tataggagac acaattctcc ctcttttaa 5880

aaatgtttaa tagcttatt aaggtgtaaa tgacataaaa actgcatgt actaaagcat 5940

gcaatttggc acacatgtat ctctacaccc ttgaaaccat caccactaga aaggtgcatt 6000

tctccccagg aagaggggca agtctaggcc cttgccaga gttgctccca gattgtttc 6060

aggttgggcc tgcattcaca gtcagccag ctgaagggtg acagcattag actcgtgacc 6120

caaatcttaa acccacacat tccattttaa cattgatacc tgtgatcatc agccagtata 6180

gcccatccca tgtgccaggc ggaggcatca ataagctggt ctgtagcagc ttatcaca 6240

gctggggagc caggagctaa ggaatgctag actcccttgt aaacaattt aatgggggt 6300

acttagcctg gactctatgt gttctcate cacctttct cagggagatt ctggccaagt 6360

cctggaacct actgcagtcc atctgggtgt tgacagatat gtggacggat tggcaggctg 6420

ggacccaatc tatgtttgcc cttgtgttca gttttgagac ctagcacctt tcctgatcct 6480

gctcacagac cccctgcggc caataggaaa gaagtgtttaa tgcataattt ctttggagg 6540

gccccaaagcc aggcccagag agttgtcaag ggcggtcagt ggtgggtgga tggcagagtt 6600

aaccaaggag ttacacacct gccttagacta aggacaggct ggaccaagta gagagggtgg 6660

ggctaaggga gcctgagaga tgctctgggg cctgtctcaa aatgagcact atagtcaccc 6720

tgtccccgtgc agagattgtc tgacctgggtt ttaggtcaca cccaaccccttg ccagccaagg 6780

agtctttaga agcctgatata tgggagaccc tgcctgggtt ctacaacccc agaactcact 6840

gcagaagccc acgtggatttgc ctatgtctgc tcagccatat gggtccccaa ccctcaccc 6900

atgatagtcc tgtgagaaac cgctgctgac cctttgttca tgttttcatc ttttccacta 6960

taaaaagacat gctagctggg aaatagagcc catcatactc aagagtggca ggagccaggt 7020

cctggccctt gaagcttggc ctcacacaca gaggccggca ccctgtcatc aattccctca 7080

gctttttctc cgcctccact cccagtccta gatttagcag ccatgtgtgg gtggggccca 7140

ctgcagggat acttacccac ctaccagaga gatggcctgt gggtgctggc ctttcgtagg 7200

ctgtggaggt tggaggctgt ggcagcctgg gcagtcaggc tgtggtcctc ccatgttctt 7260

gactcctgct agtctgggct gcctcctgat taggggttgg atgctccagt tcttcctgg 7320

gttggggatt gccaccctac tcccagccca tccaggttca cgcttattcc aaagcggagc 7380

accagcagtg tgcctgctgc gggagttctc cgtgtccagc ctgagggttg cctgccaacc 7440

cctctgagag gtgcccgag gctgtgcgcc cacactgccc agcagtgcgg agaagcaggc 7500

ttgttttcc ctgtcaactgg ctggaaagag atgctttgtt ctagggagcc gcatgtcccc 7560

ttgcctgcgt tgttggtag gagccagcag gctccgtgga gggcaggcta gcagcctggc 7620

accagggagg caagggtctg agttcctagg agggtgttg ctcatgtgag aagtctgcaa 7680

agtttactac tgagcaccat ctctctgtct gaaaaacatt tttcatttt ctgtgaacca 7740

ctaagtttcc cgittggct ttcttcctgc ttttggctct tgtttaggca ggcgttagcca 7800

gatccaagcg tctggctgct tccccatgtc ttcagacctc ttttctgtt catggtaact 7860

atagatggaa ccacacattg gaagctggaa actcaagcgg tgcagcctat tccttacccc 7920

aatccctgtt ttacaaatgg ggaaatcaag gcacagcatg gggtgatgct tatctgaggt 7980

tggaagagtt aatagtagag tggagctaa aacctcgttt cttacctcca agctcaggc 8040

tttcagctgt aattgaggct agtatacttg gtgtgcagca tcagggattc cagctctaaa 8100

ggtcacaaaa aggacccggg ggtcattggc ccagggtggg aacctgagca gagcagggcc 8160

agatggtgca ctctgtgcc tggccttagt ttcttgctgg atgctttggc cgtagagcc 8220

ccagagccct gcttccagaa ccactccagt gacgttcatg ccaatggcct gaaccccact 8280

gagcgagggt gccctgcctc ttccacagcc ctgggctccg ctcagattt taggagcaag 8340

cgttagaggc cttgctttct ccagggtcag catgtggaca gaacacttac tctctgcctg 8400

tctctcctcc tcaaaatgga agcaagacag tggggcctac aatgctatga aaaacaggat 8460

ggaaagaag cctgctctc gccttcctgc ccaggtgagc catcacctga ctaagtgagt 8520

tcacactcag agcgtgtgg gatggcagga tgttctgact tcattttcca ggatgcctt 8580

gctttaaaac cttttaaaaa gaagtgaatg atacaccccc tttgctcatc ttgcagtgg 8640

acctggtgtg tgaggacgac tggaaaggccc cactcacaat ctccttggc ttctgggtg 8700

tgctgttggg ctccttcatt tcagggcagc tgtcagacag gtaaggtgtc tgtcttctgg 8760

agcaccaggg gacctcagca ctgaggaaga agcgtgtgcc tggcccttga tttcagttgg 8820

tagtattctt tcagcgcagg gccctgtatt ttaaagaaga ggaagctatg tctgtat 8880

agactccatg cctagtaaga agagccaaca aatcatctga ctccgttaatt cttgctaagt 8940
aaagaaaacct gagctgtcta agctgaatgt atctgtgatc cggttgacta ggtaatatgc 9000
catgattcac ttctgcagta gcctggcttg cctccctgg gtcactgtga ctctgtcatg 9060
ccccctgagca tgggagaggt tgacatcatg cacacatgca catgtgctag atttagatc 9120
tgttagtagtg ccacggtgtc tgcctctgta gtcccaagaa gaccaggatt ctctctgcaa 9180
agtgaaagga gctctcacca gccactagtg gtatgaaaag cagaactctt ttgtccacaa 9240
ggctgatgcc ccttagctaa gtggcctgtg gttttggcat ttactttatg acaggaggga 9300
aatagtagtt ttgatccatt tcttataagc aggttatttg tataattcta aagctttaa 9360
ctcaaggaaa cattaacggc ttagagaatc ccaaaccctt cgaardattata tgcacaatgt 9420
tagagactac atgtgagcat tttttggag agaggtccgt agcttcatg aagttcttag 9480
aggggtccat tatgttgtt cttttccc tggagcttca gggtctgtca gagaagactg 9540
tgaagagagt agcagccttc agcaagtctt tggccacatg gcacatgtga gaacacccca 9600
caaatcggtg ggttagccgg tgaaaaggag tcccagcata ttccctgggtt ttaattcct 9660

ggcctaagg aatccctccct ccataaccc tc ccaaagtgc gggattacag gcgtgagaca 9720

ccatgcgcag ccagatattt tttattgttg ttgtttttt ttggaaaagg agtttcactc 9780

ttgttaccca ggctggagtg caatggcacg atctcggtc actgcaacct ctgcctccca 9840

ggttcaagag atttccttgt ctcagcctcc tgagttgctg ggattacagg catgcaccac 9900

catgcccagc taattttgtta ttttaatag agacaagggtt tctccatgtt ggtcaggctg 9960

gtctcaaact cccgacccatca ggtgatccac ccacccctggc ctccaaagt gctgggatta 10020

caggcgcgag ccactgcacc tgcccagcca gatTTTTTT taAAAAGCAG gttaacctgt 10080

ttattattcc tactttacag atggagaaag tgagacagag ggattaaata acttccccaa 10140

ggtttcacag ctggcaagtgc gcagagtttag gatTTGGACC caggtagttct tgctcctcta 10200

tttgttatgg actactgttc taggtccctg ctgtcctaaa acttgctttc tagcaagggtg 10260

gaatgtatta aacaaccaag tgaggaagtc gttgttgtcc ttggccatgg taagagatac 10320

agagaagtgc agggtgccac aggagtgtct aacagaggag gtcaggggca gcatccctga 10380

gaagggtgaag catgagcgag agtgggaaga tgagtcgaaa gtagccagct gaggggtaga 10440

gaggagaaaag aacatccagg cagggagaat agcaagtgt aaagccgggg ctcatgaaaa 10500

ggcatgggag caggacaaag tccgtgttgtt agaggtgcgg agagtggtgt taagatgaag 10560

gggagaggca ggcagagccc tggcagatg agcaaccagg gcttagtgta tcacagttag 10620

gactttggc ttcagccaca gagcagcggt gggctactgt gatttttaa agcaatagt 10680

tgacaatcag atttgcctt tttttttt taaagatgtt ttgacaacct tgtgaagaaa 10740

gaattgaagg gaagcaaaag gtgttgtaa gagaccaatt aaaagggtgt cacagtagtt 10800

catgccagag atgatggtgg catggcttag catgacggtg gtagaaatgg agggaaagtgg 10860

taagaggtaa aatcaacaag acttgccgat gggctggatg tcggaattgg ggaaagaaag 10920

ctttctggcc tgagtaactg ggtgaatgaa ggtacacttc tctaagacag agaatgctgg 10980

aaaagaacca cgttcatgga tattgagttt aatttgtgt tactaaattt ggggtgacta 11040

tgagaccct aagtggagaa gtagagtgtg aagctggctg tatggatatg gtactgcatg 11100

agaggttttg gctagagaaa cacatgttagg atttgcagc atatagaacc ctcagcagag 11160

ccccagatag ggatgaggtt gcctggggag aggggagtgg ggaggggagg gggaaactgg 11220

gggaggattg tgctatgctt agaggccacc tgagtggaca tggagattc cttctcacgg 11280

agctaagtga cagctgcggc tcagaagaat gcccttgatg taaaaggag atacccaag 11340

ttcagagtag aaatgcagtg tattttctg ggtcagctgt gtcatgggtc agcttaagaa 11400

ccttcggcc atgtgacaca atgattacct gagaaagca tttaagttcc aaaaggtcta 11460

ttcccaggga aagtggaaac aaaatttgtg agtgttta ggaccactt agtctacaga 11520

agggctaata tagtgtttt caaaccttc taaacattt ggccacagaa ctttcattaa 11580

agtaggataa tttaagtcta gtaaatgaaa tacaccctaa gtggctaaaa gtatggctgt 11640

tctgcctgca gcccctgcct tcaattccca atgcctgcc tcaaggctgt ctgtcccc 11700

ttggaaggcc cagggccctg tggatggac agcttctgag tgcattactt ctgagtaaac 11760

cagttctaaa acctaagcta agtagattac ctgaaagcaa tcaattcatg ccctaacttg 11820

tctaggacat caatgtact ttttatatag tataaagggtt tcacccctt tctggctat 11880

gaatatgtct gaaattcaag agcaattaaa gtactcctgg gttgtcaaag ccctttatgt 11940

aacactattg agttatctt atgcgtctga cttgtaagag atgcacaact ctaggaagaa 12000

gtagactgct gtgtcctgtt tccaggtatg tgtgtgtttg ccattttgtt gacagacttt 12060

aaaagcaaac atttctggcc ccaaccctga actgccaagg actggtgcta tgtaaagggt 12120

tctctggatc tgtctttcc ctaccatccc agggagctct taggaaggga aagggcatag 12180

agattataacc agcctgcctt gtggtagga accaccctt gttggcata tagaacatgc 12240

ttgttaaaaa aaccatgcag gggaaagtag agtctactac cagggagag tttctcaacc 12300

tcgaccctat taacatttg agccaaataa ttttgttcta gggcatttc ctggcattt 12360

tagaatattt aacaacatat ctggcctcta ctcattagat gccagtgaac cccaaatgtat 12420

ggaaaaaaaaa aacaacaaca gaaaaaaaaacc tcttttattt agaaaaaaaca ccaaactctt 12480

ccacatagtt gcaagacattt gtcaatttg ctccttagcc accactgtac tcttgaattt 12540

cacgcctgat gccaaccaca ctggttcctc atgttacca tgccccctcc agccatgggg 12600

gtgtgtggtc ttctcagagt ctgaaggattt ccccacccac cccaaacccac cccctgtggc 12660

cttcttaac catgctggct aattcaggat ccctagttcc ttatgacttt cctttaaaac 12720

gtctaccaga aattggggga aaaaaagtgt tattatagga ttaatgttgg tcttccccac 12780

tatactgtga atatcatattga gagcttggtc cctacacacctt aaatccccca tcgtcaacta 12840

ttttttccca tctcagtgtc ccatgatcaa ggagaccctc cctgaatgtc cagttcccca 12900

acccttaccc ccagtccagg gtagcttcct tccttgcc tctcattaac ctgcattgcgg 12960

atccttcagt gcacttgact cagtgtgtaa ttgttatattc agtagcgtgt tgtagatta 13020

aaatgtggtt aatatgtgtt tcaccagtta tactatgaca ctccttaagg gcagaaacag 13080

catctttttt aatttattga tatccaagtg ccctctataa tagatgctca ataaacattg 13140

aatgaaaagtg ggtgtcagcc agtactggcc agactcaaac tgaacccact gcttcccact 13200

agcttgactt tttcctcctg tttgtggcac tctctttaaa acaaacccaa ataaacccaa 13260

ttttaaaaac tttttaaaat gagcacggat acagaaaacc acacagaaca aatgtgttagc 13320

ttaatgaatt tttttcagag aaataaacctt atgaccacca ccaagtcgag cagtagaact 13380

ttgctgtcca ctaagaagcc ctgtccatgt gccccatccc aattacagca tcctctct 13440

ctccccattt agtaaccgct agcctgactc ctgtataat cacttccttg tgagttttt 13500

tagttttattt atcgaaatat gcatccttga cacaaattta gtgttgcggca cttaatataat 13560

ttgatgtctt ttagtctact taatctatgg attctccttc tatgcgccttc tatgccttac 13620

tgattatcta tgaagaacct gagctattcc acctatatggaa ttcccagtc tggatttgg 13680

gattgcacac tcatgtatgca gttcagcaca ttcccttatg ctctgcattt cctcaaaaatt 13740

ggcagttgga tccagagact tgagattcag gttctgattc aggttcagtc ctttggcaa 13800

gaccatagga agcatgcaat tcctgactgt ctctttatga tgttaacagt aattagtata 13860

taatgcatac atctattaat ccattggggg ctataaatgg tattattcta attttattac 13920

ctttcattt aaaagttaga atactttgt acatgatact acctcttatac tattattggt 13980

tgctgttcac atagtttaca aaggaaaatc aggacaaatg cttctttctc tttatggcc 14040

agttttcatt tataatgaat tttttctctg ttattctcca aatttggcag atttttttt 14100

aaaaaaaaata tcattatgaa tgtatggatt aaataattga tgtatttcag tctttgcaa 14160

tcattatcat aattgttagca ttgctttta ggcaaccctg gtacccaggc tgtacatttgc 14220

tcatggggag tggggagggg gagaaatagc atggcactg tgagaccgag actgtccctg 14280

gcagccagta ttctggcaac actgttcaca cccacttact ggtatggatct tgagaaagcc 14340

ccacttggtg gagccattc ctgctgccct tttccagctg gttatctgtc actctccttt 14400
tcttcccagg tttggccgga agaatgtgct gttcgtgacc atggcatgc agacaggctt 14460
cagtttcctg cagatcttct cgaagaattt tgagatgttt gtcgtgtgt ttgtccttgt 14520
aggcatggc cagatctcca actatgtggc agcattgtc ctggtatgg ccatcaggtt 14580
ggagttgagt acttgatcct gtatttcacc atcatccat cacctacctt tctggagaca 14640
gctgtatgt ccctaaggg ggacagggtt tctaacaaaa ctagccagag cttcctgggt 14700
aaccttactt acaggcaggg aaactgagcc agacatgaga ccagcctggg gtccccagca 14760
gcacaatggc ctgacttctg atttccagtt ctttctggc ctctggctg tggctccttg 14820
gtcttagtac ttggtagtca atttactagg actcaccaga gatcctccat ttacaaaaag 14880
ggcctgccac tgcacagggc tgagccagcc ccagaaagag ggccgcattt ttggaggagg 14940
aggggctgtg actggcaagc ttgctaaggt agagaacccc ttgtctgcag agcactgtgg 15000
ctggtagat ctacggacaa gaataaattt ataggaaggg gctttcgta cttcagggt 15060
tttaattcag agtgcacact gcagggcttt gtctcaaattt tgccagcctg ttgtcactga 15120

gaagctgcc a ggccggcctg t gtttggagg aacctgactc tagctgataa ggccttgag 15180

t tccttgggt t gtattgtt g aaagggttgt tttttttt tataatata attcttcct 15240

t gaggcttaa gtcagcatgt gctgacttag taatgacttc acttttaata aattttcct 15300

catgtgagga t taaaggggg cctaccatgg catcttagc acatggcttc agaacatggc 15360

gaaatttca agagagaact gttgcttggg ggcctgagag gccacaggga tgtacccca 15420

ggagacagtc agacaggagg gttcagaac gccatccgct ccctagcgcc atgaacttag 15480

agagagttct cgctgtttc ttgtctgtgt attcacaaag ataccataaa aaattaataa 15540

ggaaggaacc caaattaaac tgctaactcg acctccctt g tttgaacag ggacagaaat 15600

tcttggcaag tcagttcgta taatattctc tacgttagga gtgtgcata tttatgcatt 15660

tggctacatg gtgctgccac t gtttgc tta cttcatccga gactggcgga tgctgctggt 15720

ggcgctgacg atgcggggg tgctgtcg t ggcactctgg tggtagtgt gaccctgtgc 15780

cccatgtgcc cactggcagg atgatttctg tctggccttc actagaggc agcaacaacc 15840

catgaatccc tattttgtct cccagagaca ggaagcatag attataaatt attcagaat 15900

gttttctcca cactcaaaag agccaaaaca aaacagaatc ccatgacagc aacagacttg 15960

ctctcagccc tgtgctgggt tgccccaaagt gtggggaaaa atagcagtag ctgtgagaag 16020

atggggtcca gcatgcctg taggaagttc ccaaggctca gggcaggaca gtgtaggccc 16080

tagttctggc tgtgtgctgc tgaaggctca tgccacaggc actggcacca aaagcaagag 16140

tcctcagggt agccacatgg aggaagccag gtccttctg caccaccaag gtagaggagt 16200

tgaacaggca gagaagaggc cattccagac caagagggga acactgcaga ggtgctaagg 16260

tgggaatcac cccttgcagg tggagaaggt gagatcacca gcccaagtgg agcagagagc 16320

atttcagggc atagtgggag agtaagccgc acatcatggg gcccagtcat gaccgagggt 16380

ggggggcgcc tacctggtcc cagcaaggtg gaaaataata tccatagagc actcaagtgc 16440

cttgataaac atgctaattt tttcctttt tttcttttct ttttctttt ttttctttt 16500

tttttcttag acaaagtctc tggcccccag gctgtgtgc agtggcgtga ttccactta 16560

ctgcaacctc cgccctccccca gttcaagcga ttctcatgtc tcagcctccc gagtagctgg 16620

gactacaggt gcctgccacc gcacttggct aattttttt gtatttctt ggagagacgg 16680

gtttcactgc gttggccagg ctggtctgga actcctagcc tcaaatgatc caccggcctt 16740

ggcctcctaa agtgctggga ttataggagt gaaccactgc acctggccaa acatgctatt 16800

ttaggttagag tatctgacta atctgttggaa taaatcaggg gtagggtagag gagagaagag 16860

aagctaaaag gccagtgcag aagcttctgt tggtgccggg gacagggagg agagtgtac 16920

agggcctggg ctgacataga catgcacaga agccaggctt ccggagccca tcttgcaccc 16980

atctcctcag cccagcagat ggcaacactg ctcttcagaa atggaggtgg ccagccagca 17040

tggggatgcc gtcagggggt gcagggctct cccatTTTG tgcggtgtgg ggtacacata 17100

agctcatcca ccccaggta ttgctgcgtg tggatcagct ctttgcttct ggcttgtat 17160

caccaaacat tccacaagct ctgggtctgc aaccttattc ccacctatgg ctgtgctcta 17220

cctggctgt gggctgtgtg ttggcaggga ggcctcactg agattggacc ttgtactgcc 17280

aggttcatcc ctgagtcggcc cgatggctc atctctcagg gacgatttga agaggcagag 17340

gtgatcatcc gcaaggctgc caaagccaat gggatttttg tgccttccac tatcttgac 17400

ccgagtgagg taagcaccat gtgggtgtgg gtgagaggga cagactgacc gtgatttgag 17460

agcagcagca cccagccctg aagtccccc tgctcacagc agcccagccc tctctctgcc 17520
caagccccaa ctgccccattc ccccccattcc cccactcccc accccccacac gggccctgtt 17580
aacactcaga agttgaggaa taggitacag ctgcctcact ctttcacca cgggtttcag 17640
attttcattt ttacttcct ttctaggcaa tcataatattt taaccattac ttctaacaat 17700
aaatactctt tttagtaat aggcccttca taaagtcagc atttggaaa atcatgttt 17760
cttataccta aggtggcttg tcaccttaca aagctaacc caaacgtaaa atgtaaagca 17820
caaatacgatt tggagttaga agtatttcat ctcttgagta ttagcaatta ttcattaaaa 17880
agaaaaaaaaa agtgttttagt ctcttctgc cctccatgg ttaattattt catatcatct 17940
tggagtcagg tccttttga tgtccacctc ttccccctac cccacccctc ccgtcagccc 18000
tgttctcaca caccatgact catttcttgg ctctacctag ttcctgggtc ttgctttcc 18060
ttcccggttcc ctctccattt atctctgttag caggcagttt tccttgggtc cgtactatg 18120
agaggttaga agctgtaaat gctgcctgg ggggtctgg aatgtgtctg tgggtctgact 18180
ggaagatgag gggttgggtg tggaaacagc cacaaggcagc cctgctgaag tgtgagaggc 18240

aggcatggtt gggcttgaa aagagggAAC agttattgtA gacagcggAG gccaatggCC 18300

actgccagCC ctgcagACTT cccagtGAGt ggtggcccAG cAGccACTGT cAGcatgcAC 18360

cagaaaggGGG tcctgtgcGC aaaggTCAGG caggAGTGTg gcAGAGGGCT ttTAAGTTAG 18420

gtggTTTgg gggCTTTAA gtGAGGGGTC aatctGGGTg aatgcATAAG ccccACTggC 18480

atcttGAGG aaatGAGGCT attcAGGGG atacttCAG tccAAAGTTG acctttGTT 18540

gaacttctaA ctctggaaaa acaagctcca aacctGGGTT tgcttaAGAA agcaACATCA 18600

gtgtgtttAG acgtgtggTT tattaatggc cttggctgtg ctGAATTCA taggaAGTCA 18660

ctctgggtGA agctcAGGTC aatttcctG ttttctatt tgaattctt ttccctggAA 18720

gcacaccAGT aactacatAG tataAGGACT caaaACATTA acttttAAAA aatATCAGAC 18780

caataAACCA cacAGCCAGG tactctctT gACCCAGAGG gcAGGGAGCC aggcttcggG 18840

aggaataACTT agaggcCTCC ttGGAATGTg gCcAccGACA ggaatATGTg ggggtgcAGT 18900

gaggaAGCTG tcAGCCTGGG CCTCTGTCTT CCTGTACCT TGAGGGACTG gTCACtTACT 18960

tttcctcATT ttcattcACT ctgatttGTT ACTGACAAGG CCTAGGGAAg ttTTCACAGC 19020

ctaaaacaca gtcagtatac ttactgttct tagaaacgta acactccccg acgctgagat 19080

gcagacagct aagatgccag ggattcaagt atgttattgt gtgctctgag tctctgacca 19140

cctttcttc ccatacactt atgatgttgt tcctcgagg tacaagaccta agttccaaga 19200

agcagcagtc ccacaacatt ctggatctgc ttcgaacctg gaatatccgg atggcacca 19260

tcatgtccat aatgctgtgg tatgtaaaag agacatgcct gaggcttcca gacaaagctt 19320

cttgaagtgg ccattggcc tcttggttac agacatgcct cagacaaaat tcaaaggcta 19380

tgtcatcaga gagtgaaaag gatatgtctt gtgttagatg gaaaaaatgg gcatgtcaca 19440

attcttaatg ggatggaacc tcagaaaagg agaataaaaa caattgtgga ggctgttgt 19500

gaaaaatatgg actctcggtgg ggaatctctc cagatctaa gatgaatcct tgcccaattt 19560

gggtcattta gttcccgct cctaccagg taccgacagt ggctgaggag gccaggtagg 19620

gcttttaaga aggatctgag tgaagacacc atgtcctgta ggctgcagag gctgccagtt 19680

actttctgga aatgtggaag tggatgtgc tcctcctggg atgtccataa acggcctgg 19740

agtcagggct atagcctaga tgtccttacc aggttcccac taatgaggca aagtatgtca 19800

gaaaggatt tgtgaattac cagggagagg aaacatgtcc aagtgcacat cgctagctt 19860

tgctcagcgg ccgaaccctg ggattctagg cgacttctgg agcctggtgg gttagcggtg 19920

agaagatggg cgaggagggc ggacttcata tcagagtcct tattactagt ctcatccagc 19980

ttttaggcag tcagccactg tgcctactga gggagtgcta tgagtcaccc gcttccaagg 20040

aatggcccag gatccctcca ggcagttcac cattccctga gttggcctca agacaggagc 20100

agcatgttagc ctgcaccaca gacatgcaag cctgtgatga gtcacccact tttgtgtca 20160

cccaggctct cctccctgct ctggatttcc tggggactca tgcacatact cttttattg 20220

taccagctgt gtgttccacc tgcagatgag tcaaaacagt ctaatccata aaggctgg 20280

ttgtcaaaga gtgtgggtca tcaacagaga gaatgcctac tggggatgcc caggtcaggg 20340

gtactgcagg gcatcctgat gagaggcagt gtggccctc cattgggagc cacctcttg 20400

ctccacaagt accgcggggc tggtgtcagc tgtctctgac cagcctttc ctgactggc 20460

accacaggt a gtgtgtgagg gtctcttcc aagtgttga ccta atgttg ttccctttgt 20520

tatcttatcc cccaaatcct atcacaccc acttgatgtc tgcctcctga ctcattctt 20580

agctccttct gcagttgctg gatttgagga ggttcagctt aggatttta aagctgaaag 20640

gcagggttggaa atttttcttt tcaatgaagt aaatctatct gaattataaca agctttttg 20700

ctgggacact gtctataatgg aaggctctga gagcgcactg ggcgcagggtt tacactgtac 20760

cacttgggct gggaaaatt atcttttgcat ctagtgcatttgcat 20820

tgctgcctta ctagtctctg cttaaagatg gtttggaaatt tactgaaata attgcattgt 20880

aaaagttgta caggttggaa aagatgtggaa tactgcttt ccagctttct tctgcactct 20940

gtttcaggat gaccatatca gtggcattt ttgggcttc gcttgataact cctaacttgc 21000

atggggacat ctttgtaac tgcttccttt cagcgatggt tgaagtccca gcatatgtgt 21060

tggcctggct gctgctgcaa tatttgcccc ggcgcatttc catggccact gccctttcc 21120

tgggtggcag tgtccttctc ttcatgcaggc tggtacccccc aggttagggac catgtgcattc 21180

tatggtttgg ggtcttcact gagtctctta ctgtctacca ggctgtctca attaataaag 21240

agaataaaat caagcccatc acagctccct tgcttatata cattcttggc ctaaaaatca 21300

atagaaaatgc tcttctgaga ctagaacact tatggcctgg gctttgaggg agtggaaaa 21360

agcagccatt ggggctgttg gttaattttt ctctgtaccc aagttaatgt gtcataactg 21420

ttttccactg cagaagaaga gggaaagaaat agctatccca ttccttttt tcctggccct 21480

gtcttcttta tttattcaac aaatagctat ggcatgccta ccatggcgt ggcactgtgc 21540

tcggtgataa cgatacaccaa gaaaacaagg caggcagaac cccaggccct catgaacgt 21600

acaccctaga tgagaagaca gacaacaaac aagtaaataa aatgcttaat atagttcaga 21660

ctgtgttacc ttcttaggaat acaaatgaag gacaatgccg agttagttt catagtcaca 21720

gatagtgtcc ctgaacaggg ggcagttcag tagaaatgta cataaaagtga cagaaagccc 21780

tgaaaaagtc taggagaaca ttttaggaag aagaaatggc aaaggcagcg accctgagca 21840

gggatgagc ctggcatgtt tgaggaggag ggagaagggg aggggccaga ccactgagag 21900

ggcctcacag acccttagca ggattttatt tctgaaacta tcttagtac ccacagatgg 21960

gtgggaggta gccatttcca ataatttata gaacagttca tggccctca tctccctc 22020

tccatcactg tgcccagaga cttcagtgtt cctgttagatt tgggagcctc tcatggcac 22080

ttttggccc atcaggctga gaacactgca cggaaacagc tccccatggg atgtggcagg 22140

aggagccag aactgatgt a gaggctaca gctgagctca gagtgacctt caggcacac 22200

atagctctcc catcagcaca gcacagagag attagaagat caactcgaga ttctgatggc 22260

ctatgattt tttgaggtct gagtggagg aaagcatgaa atgagttaga actgaattct 22320

ccattcatct aaacatcatg agttaattcc atagtgcctg cagtgtgagg ttctgggtg 22380

acagttaatc cctgacagac atgtcttaa tgacttatag actggaaagc aggttgattg 22440

gactattaag gagcttactc tgggtgtc caggttgagg aaagtgcatt tccttatagc 22500

tgcaggtccc agcctccctt cagcaatcaa tttggaggga aatcttggtc atagccctt 22560

ccccacaaat aggaagtgt agaaactgac tccccaaaaa atttggaaag aaagtatgtt 22620

tgtttgctc tcaatagctg catgccatgg gttggtagct actcctaccc tcttccttt 22680

gcttctccag acttgttata tttggctaca gtcctggta tggtgccaa gtttgagtc 22740

acggctgcct tttccatggt ctacgtgtac acagccgagc tgtatcccac agtgtgaga 22800

aacatgggtg tgggagtcag ctccacagca tcccgctgg gcagcatcct gtctccctac 22860

ttcggttacc ttggtaagtc ccatgagcca agggcacact agagcaacgg gatggaagta 22920

ctaactggct tgaatgtgag ctggaggttg cgtgttaaca ggaaaacaag ttcatacagt 22980

acatgggctc catccagtagc tggatctttg gccgggaagg gttcttgccc cagtcactg 23040

gccctcaatt tcaaattggaa aacaacctat agattaccta gaaattgatg agaatattag 23100

agggtttgtt tctgttttag ccatcccagg cttccatca gagactacaa ttctttatc 23160

ctaagaacct acagagtggt ttagggagcc agtgtgctta gttggagaaa tttcttgaa 23220

tcagagtttta aaaggaacat gaggggaaag atgtccatgc aagaggtctg atgaacgtaa 23280

aattattata acctagagca ctatagagtg atttatctt gtgtgaagat ccacccatg 23340

ccatttatg tagcaggtct ccagtttct cttctcagaa ttatgtctc atagcacctg 23400

tggttccct gcacatccct agccagtacc tctttaggga gggtggcacc cacctgagag 23460

tactcagagt gctttgtcaa catgctatgt agatctaaaa gcaagcaaaa gcaccctgcc 23520

taatctgaag gcagatcaca tgggctggga cacatctgca gaggtggaag agttatttcc 23580

atccctggac aagtacctca ggttccttgg aaacccaacc ttggtaaata agaataatca 23640

gcatggccca gaaataggaa taatcagcat ggcccagctc ttctcctgca accggccctt 23700

tgtactcctc ccctgcatgg tggaacactg ctgggctctg ggcatgcctg tgccagctct 23760

gggttctgaa acctgtctag atgccagatt ctaatctgac tgctcagact gtgagagatg 23820

tgagaccaag aaggaaagtg atccccttcc agagtcctgg gagcataaag ggtagatga 23880

gagaccaagt ctaactgcag ccctgggcct gaggctccgt ctgctttgc ataggtgcct 23940

acgaccgctt cctgccctac attctcatgg gaagtctgac catcctgaca gccatcctca 24000

ccttgtttct cccagagagc ttcggtaccc cactcccaga caccattgac cagatgctaa 24060

gagtcaaagg gtaagaagac ctcctctgtc agtgttigatg cactgggtct gggtctggcc 24120

aggctctcagg agcccctcac aatagagcta ctgccaaact ccctctcaca gacaccatgg 24180

actagtttag ccattaaagg gttgtaaatg gcaagggtct tacttatagc ccatcctctc 24240

tggctctgttc ctgtgtggac atgtcaactat acacatctcc atggcagtag ccgcactgga 24300

taactcagag gctagaagaa acccttcaga atctgctgca ggattctctt cccagggaaag 24360

atatcctcag ttcttggatg tttggagact gggaggcatc tttttaaaat gtgttactga 24420

catatttttg cttgtttta tagaatgaaa cacagaaaaa ctccaagtca cacaaggatg 24480

ttaaaagatg gtcaagaaag gcccacaatc cttaaaagca cagcattcta acatcgcttc 24540

cagtaaggga gaaactgaag aggaaagact gtcttgccag aaatggccag cttgtgcaga 24600

ctccgagtcc ttcagtgaca aaggcctttg ctgttgtcc tcttgacctg tgtctgactt 24660

gctcctggat gggcacccac actcagaggc tacatatggc cctagagcac cacccctc 24720

tagggacact ggggctacct acagacaact tcatactaat cctaactatt acaatgatgg 24780

actcagcacc tccaaagcag ttaattttc actagaacca gtgagatctg gaggaatgtg 24840

agaagcatat gctaaatgta catttaatt ttagactact taaaaaggcc cctaataagg 24900

ctagaggtct aagtccccca cccctttccc cactccctc tagtggtgaa ctttagagga 24960

aaaggaagta attgcacaag gagtttgatt cttaccttt ctcagttaca gaggacatta 25020

actggatcat tgcttccccca gggcaggaga gcgcagagct agggaaagtg aaaggtaatg 25080

aagatggagc agaatgagca gatgcagatc accagcaaag tgcactgatg tgtgagct 25140

taagaccact cagcatgacg actgagtaga cttgtttaca tctgatcaa gcactggct 25200

tgtccaggct cataataat gctccattga atctactatt cttgtttcc actgctgtgg 25260

aaacctcctt gctactatacg cgtttatgt atggttaaa ggaaatttat caggtgagag 25320

agatgagcaa cggtgtctt tctctcaaag ctgtaatgtg gttttgttt tactgtttat 25380

ttgtttgttgc ttgtatcctt ttctccttgt tatttgccct tcagaatgca cttggaaag 25440

gctggttcct tagcctcctg gtttgtgtct ttttttttt tttttaaac acagaatcac 25500

tctggcaatt gtctgcagct gccactggtg caaggccta ccagccctag cctctagcac 25560

ttctctaagt gccaaaaaca gtgtcattgt gtgtgttcct ttcttgatac ttagtcatgg 25620

gaggatatta caaaaaagaa atttaaatttgc tgttcatagt ctttcagagt agctcacttt 25680

agtccctgtaa ctttattggg tgatattttgc tgttcagtgt aattgtcttc tctttgctga 25740

ttatgttacc atggtaactcc taaagcatat gcctcacctg gttaaaaaaag aacaaacatg 25800

tttttgtgaa agctactgaa gtgccttggg aaatgagaaaa gttttaaataa gtaaaatgat 25860

tttttaataa t 25871

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

gcaggaccaa ggcggcggtg tcag

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

agactagagg aaaaacggga tagc

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

agatttttag gagcaaggcgt taga

24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

gaggcagaca ccgtggcact acta

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

ttcacaccca cttactggat ggat

24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

attctgtttt gttttggctc tttt

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

agcaggccct gggctgacat agac

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

aaaggaccgt actccaagat gata

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

tctgaccacc tcttcttccc atac

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

gcctcctcag ccactgtcgg taac

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

atgttgttcc ttttgttatac ttat

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

cttgtttct tgtgtatcgta tatac

24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

tatgtttgtt ttgctctcaa tagc

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

tctgtgagag ggagtttgcg agta

24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

tacgaccgct tcctgcccta catt

24

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

tcattctgct ccatcttcat tacc

24

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

gataagctta cggtgtcccc ttattcccat acg

33

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

cccatgccaa caaggacaaa aagc

24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 24

tgttttcgt gggtgtgctg atgg

24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 25

acagaacaga aaagccctca gtca

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04853

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68, C12P21/02, A61K48/00,
A61K38/17, A61K45/00, A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68, C12P21/02, A61K48/00,
A61K38/17, A61K45/00, A61K31/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

GenBank/GenBank new/GeneSeq/pir

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THE Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 32, (August, 1998), Tamai I, Ohashi R, et al., "Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2.", p. 20378-20382	1-9
Y	Biochemical and Biophysical Research Communicayions, Vol. 46, No. 3, (May, 1998), Wu X, Prasad PD, et al., "cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family.", p.589-595	1-9
PY	WO, 99/13072, A1 (CHUGAI RES INST MOLECULAR MEDICINE INC.), 18 March, 1999 (18.03.99), Full text	1-9
A	FEBS Letters, Vol. 408, No. 2 (May, 1997), Masuda M, Kobayashi K, et al., "A novel gene suppressed in the ventricle of carnitine-deficient juvenile visceral steatosis mice.", p. 221-224	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 November, 1999 (17.11.99)

Date of mailing of the international search report
30 November, 1999 (30.11.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/04853

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68, C12P21/02, A61K48/00,
A61K38/17, A61K45/00, A61K31/70

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68, C12P21/02, A61K48/00,
A61K38/17, A61K45/00, A61K31/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

GenBank/GenBank new/GeneSeq/pir

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	THE Journal of Biological Chemistry, 第273巻, 第32号. (8月.1998), Tamai I, Ohashi R, et.al., 「Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2.」, p. 20378-20382	1-9
Y	Biochemical and Biophysical Research Communications, 第46巻, 第3号. (5月.1998), Wu X, Prasad PD, et.al., 「cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family.」, p. 589-595	1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.11.99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

齊藤 真由美

4 N 9839



電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
P Y	WO, 99/13072-A1 (CHUGAI RES INST MOLECULAR MEDICINE INC.) 18. 3月. 1999 (18. 03. 99) 全文	1-9
A	F E B S Letters, 第408巻, 第2号. (5月. 1997), Masuda M, Kobayashi K, et. al., 「A novel gene suppressed in the ventricle of carnitine-deficient juvenile visceral steatosis mice.」, p. 221-224	1-9